ORSAY
série A
n° d'ordre
1152

T H E S E

présentée

à 1'UNIVERSITE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

pour obtenir le grade de Docteur ès-Sciences Naturelles

par

Françoise LE HEGARAT-MARCHAND

ETUDE GENETIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DE LA BIOSYNTHESE DES PYRIMIDINES CHEZ COPRINUS RADIATUS

Soutenue le 21 Juin 1973 devant la Commission d'Examen

Mme M. GANS	)	Président
MM. G. BUTTIN	)	
F. LACROUTE	)	Examinateurs
J-C. PATTE	)	

ORSAY
série A
n° d'ordre
1152

T H E S E

présentée

à l'UNIVERSITE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

pour obtenir le grade de Docteur ès-Sciences Naturelles

par

Françoise LE HEGARAT-MARCHAND

ETUDE GENETIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DE LA BIOSYNTHESE DES PYRIMIDINES CHEZ COPRINUS RADIATUS

Soutenue le 21 Juin 1973 devant la Commission d'Examen

Mme M. GANS	)	Président
MM. G. BUTTIN	)	
F. LACROUTE	)	Examinateurs
J-C. PATTE	)	

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé sous la direction de Georges PREVOST au Centre de Génétique Moléculaire de Gif-sur-Yvette et au Laboratoire de Biologie Générale de l'Université Paris XI, Centre d'ORSAY.

Il est dédié à la mémoire de Georges PREVOST qui, après m'avoir amicalement accueillie dans son laboratoire, m'a guidée activement lors de mes débuts dans la recherche scientifique et m'a ensuite accordé une grande indépendance sans cesser de me prodiguer ses encouragements.

Je remercie vivement Madame M. GANS qui, tout au long de ce travail m'a aidée par ses précieux conseils et son amical enthousiasme, d'avoir bien voulu présider ce jury.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Messieurs G. BUTTIN, F. LACROUTE et J.C. PATTE, membres de ce jury, qui ont accepté de lire et de corriger mon manuscrit.

Madame M.L. HIRSCH m'a fait profiter de sa haute compétence scientifique, je lui exprime toute ma gratitude.

Je désire remercier tout particulièrement pour leur collaboration technique Madame D. GIRAULT, dont l'aide m'a été infiniment précieuse, ainsi que Mesdemoiselles C. BIZOT, M. MASSON et Madame F. COURTEILLE.

La réalisation pratique de cette thèse a été menée à bien grâce à l'aide de Mesdames G. BOISSONNET, S. CHEVAIS, M. DAHURON, A. FRIEDMAN et Mademoiselle M. SLIWA, je leur adresse mes plus vifs remerciements.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

S O M M A I R E

	Pages
INTRODUCTION	I
Voie de biosynthèse de l'uridine-5'-phosphate de novo	II
CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES	1
A- TECHNIQUES DE CULTURE	1
1) Biologie (rappel)	1
2) Souches utilisées	1
Liste des souches	2
3) Milieux de culture	2
4) Modes de culture	2
a) Cultures en milieu synthétique liquide	2
∝) précédées d'une préculture en milieu synthétique liquide	3
β) conditions standard	4
b) Culture en milieu synthétique gélosé	4
5) Croissance	
B - TECHNIQUES GENETIQUES	5
1) Mutagénèse	5
2) Sélection des mutants	5
3) Analyse génétique	6
C - TECHNIQUES ENZYMOLOGIQUES	6
1) Récolte des mycéliums	6
2) Préparation de l'extrait énzymatique	6
- à partir de mycélium congelé	7
- à partir de mycélium frais	7
3) Techniques de dosage	8
1 - Dosage de l'aspartate transcarbamylase	8
Dosage de l'ornithine transcarbamylase	8
2 - Dosage de la dihydroorotase	9
3 - Dosage de la dihydroorotate deshydrogénase	9
4 - Dosage de l'orotidine-5'-phosphate pyrophosphorylase	11
5 - Dosage de l'orotidine-5'-phosphate décarboxylase	12
6 - Dosage de l'uridine-5'-phosphate pyrophosphorylase	13
7 - Dosage de l'uridine kinase	13
8 - Dosage de l'uridine ribohydrolase	14

D - DOSAGE DES PROTEINES 14

E - TRAITEMENT DES EXTRAITS PAR L'ACIDE TRICHLORACETIQUE 14

F - INCORPORATION DE PYRIMIDINES RADIOACTIVES 15

a) Milieu radioactif solide (en boîtes de Pétri) 15

b) Milieu radioactif liquide (en flacons) 15

c) Mesure de la radioactivité incorporée dans les cellules 16

G - MISE EN EVIDENCE DE L'EXCRETION DE PYRIMIDINES 17

a) Le critère biologique 17

b) Le critère spectrophotométrique 17

c) Le critère chromatographique 17

CHAPITRE II - LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE L'UMP ET SA REGULATION 19

A - BIOSYNTHESE DE L'UMP CHEZ DIFFERENTS ORGANISMES 19

B - DECOMPARTIMENTATION DU CARBAMYL-PHOSPHATE 20

C - RESULTATS OBTENUS CHEZ LE COPRIN 21

1) Les souches auxotrophes pour les pyrimidines 21

2) Activités enzymatiques contrôlées par les différents loci ur⁻ 21

3) Localisation génétique des mutations ur⁻ 21

4) Accumulation de métabolites intermédiaires 23

5) Les activités enzymatiques de biosynthèse de l'UMP chez la souche sauvage + iso 10 25

6) Conditions d'une étude physiologique de la régulation 26

7) Effet des pyrimidines présentes dans le milieu de culture sur la souche sauvage 27

8) Action du 6-azauracile sur la souche sauvage 28

a) inhibition de croissance par le 6-azauracile 28

b) effet du 6-azauracile sur les enzymes de biosynthèse de l'UMP 28

9) Régulation des niveaux enzymatiques chez les souches ur⁻ 29

10) Essais de culture sur cellophane 33

11) L'ATCase chez les souches r 35

12) Action de l'acide orotique chez la souche ur13 39

D - LES ENZYMES DE BIOSYNTHESE CHEZ LA SOUCHE arg6.su16 UN CAS D'AUTOREPRESSION 40

E - ACTION DE METABOLITES PYRIMIDIQUES in vitro 42

Action sur l'ATCase 42

Action sur l'OMPPase 42

F - POSSIBILTTE DE RETROINHIBITION *in vivo* . SCHEMA GENERAL DE LA REGULATION. 43

CHAPITRE III : ETUDE DU METABOLISME DES PYRIMIDINES EXOGENES 44

I - ETUDE PHYSIDLOGIQUE DU METABOLISME DES PYRIMIDINES EXOGENES CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE ET CHEZ LES SOUCHES ur⁻ 44

A - Incorporation de pyrimidines ^{14}C par la souche sauvage et les souches ur⁻ 44

B - Aptitude des différentes pyrimidines à supplémenter les souches ur⁻ 46

C - Pool de pyrimidines d'origine biosynthétique 46

D - Devenir des pyrimidines d'origine externe 47

E - Mise en évidence d'enzymes catalysant les transformations entre bases-nucléosides-nucléotides pyrimidiques 49

1°) uridine-5'-phosphate pyrophosphorylase 49

2°) uridine kinase 52

3°) uridine ribohydrolase 53

4°) cytidine désaminase 54

F - Incorporation d'uracile, d'uridine et de cytidine ^{14}C dans la souche + iso 10 (1) durant des temps courts 54

II - UTILISATION D'ANALOGUES DE PYRIMIDINES 55

A - Action inhibitrice des analogues de pyrimidines 55

B - Inhibition de croissance par les 5-fluoropyrimidines chez + iso 10 56

C - Levée de l'inhibition due aux 5-fluoropyrimidines 56

III - ETUDE GENETIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DES MUTANTS RESISTANTS AUX 5-FLUOROPYRIMIDINES 57

A - Mutagénèse et sélection. Classification des mutants 57

B - Localisation des gènes de résistance aux 5-fluoropyrimidines 59

C - Les niveaux de résistance des souches FUR et FUI 59

D - Incorporation de pyrimidines par les souches FUR et FUI 60

E - Etude des différents loci de résistance aux 5-fluoropyrimidines 60

Locus FUR 0 60

Locus FUR 8 67

Locus FUR 10 68

Locus FUR 11 68

Locus FUR 28 71

Locus FUI 4 72

DISCUSSION 74

ABREVIATIONS

U.V.	: rayonnement ultra-violet
N.G.	: nitrosoguanidine
CPSase	: carbamylphosphate synthétase
CPSase arg	: carbamylphosphate synthétase de la voie de biosynthèse de l'arginine
CPSase ur	: carbamylphosphate synthétase de la voie de biosynthèse de l'UMP
OTCase	: ornithine transcarbamylase (2. 1. 3. 3)
ATCase	: aspartate transcarbamylase (2. 1. 3. 2)
DHOase	: dihydroorotase (3. 5. 2. 3)
DHOdéhase	: dihydroorotate deshydrogénase (1. 3. 3. 1)
OMPPase	: orotidine-5'-phosphate pyrophosphorylase (2. 4. 2. 10)
OMP DCase	: orotidine-5'-phosphate décarboxylase (4. 1. 1. 23)
CP	: carbamylphosphate
CParg	: carbamylphosphate formé par la CPSase arg
CPur	: carbamylphosphate formé par la CPSase ur
AUS	: acide uréidosuccinique
DHO	: acide dihydroorotique
AO	: acide orotique
OMP	: orotidine-5'-phosphate
UMP	: uridine-5'-phosphate
PRPP	: 5-phosphorybosyl-1-pyrophosphate
Mm	: milieu synthétique minimum
UMPPase	: uridine-5'-phosphate pyrophosphorylase (2. 4. 2. 9)
Pi	: phosphate inorganique
PP	: pyrophosphate
TCA	: acide trichloracétique

INTRODUCTION

Depuis les travaux de LORING et PIERCE (1944) sur Neurospora crassa, CHATTAWAY (1944) sur Lactobacillus casei E montrant le rôle des nucléosides pyrimidiques comme facteurs de croissance chez certains mutants, puis de WRIGHT et coll. (1951) prouvant que l'acide orotique est un précurseur des nucléotides pyrimidiques chez Lactobacillus bulgaricus 09, la biosynthèse des pyrimidines et sa régulation ont été l'objet de très nombreux travaux, tant chez les Bactéries que chez les Eucaryotes. Les revues générales les plus récentes sont celles de O'DONOVAN et NEUHARD (1970) et JONES (1971).

Chez tous les êtres vivants, des Bactéries aux Mammifères, l'uridine-5'-monophosphate (UMP) est à l'origine de tous les nucléotides et désoxynucléotides pyrimidiques des acides nucléiques. Ce produit peut être synthétisé dans la cellule par deux voies différentes: l'une est la voie de l'acide orotique (synthèse de novo), l'autre est la transformation des bases et nucléosides pyrimidiques (pyrimidines exogènes). Le schéma de la figure 1 résume les étapes de la biosynthèse de l'UMP par la voie de l'acide orotique.

Chez Coprinus radiatus, champignon Basidiomycète, PREVOST (1962) a obtenu des mutants ur^- auxotrophes pour les pyrimidines et il a étudié la voie de biosynthèse de l'UMP de novo (1966).

Il nous a confié le sujet qui est à l'origine du travail présenté dans ce mémoire: l'étude de la régulation de la biosynthèse de l'UMP par la voie de l'acide orotique. La mise en évidence de l'effet régulateur des pyrimidines nous a conduit à étudier la pénétration et le devenir des pyrimidines exogènes. La recherche de mutants modifiés pour la régulation de cette voie de biosynthèse par sélection de souches mutées résistantes à l'inhibition de croissance causée par les 5-fluoropyrimidines ne nous a pas permis d'obtenir de tels mutants. Le mécanisme de résistance

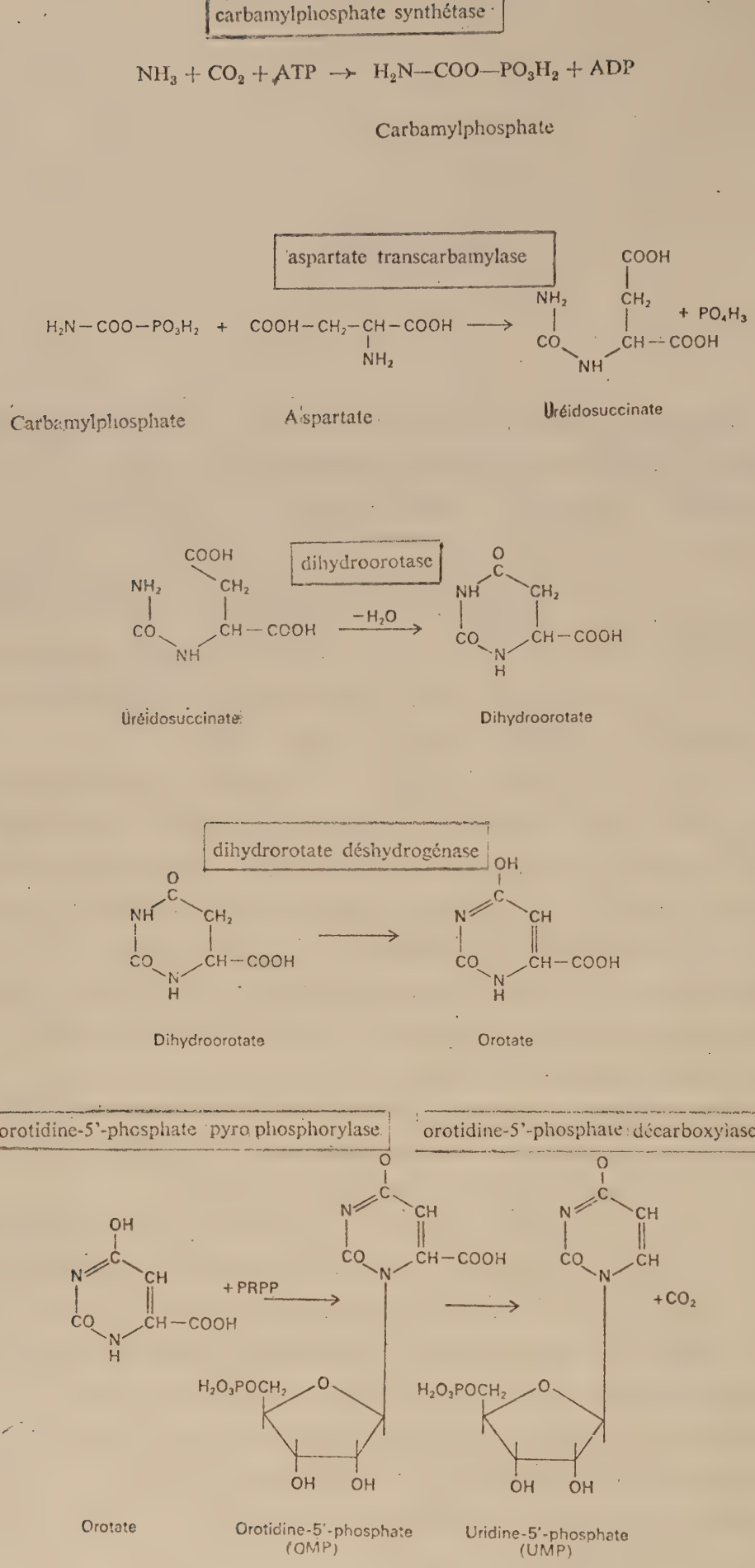


Figure 1 - Biosynthèse de l'UMP par la voie de l'acide orotique

d'après G. COHEN : le métabolisme cellulaire et sa régulation (1967). Coll.Méthodes,éd.Hermann(Paris)

de certaines souches mutées a pu être précisé. Ce mémoire comporte donc trois parties. La première partie est l'exposé du matériel et des méthodes. La deuxième partie traite de la biosynthèse de l'UMP par la voie de l'acide orotique et de sa régulation. La troisième partie est l'étude du devenir des pyrimidines exogènes et l'étude génétique et physiologique des souches résistantes aux 5-fluoropyrimidines.

C H A P I T R E I

MATERIEL ET METHODES

A - TECHNIQUES DE CULTURE

1) - Biologie (rappel).

G. PREVOST (1962) a décrit les caractéristiques biologiques de Coprinus radiatus Fr. ex Bolt. Le cycle de ce champignon basidiomycète comporte une phase monocaryotique qui commence par la germination d'une spore mononucléée et une phase dicaryotique qui aboutit à la caryogamie puis à la méiose au cours de laquelle se forment les basidiospores. Les dicaryons ne peuvent se former qu'à partir de filaments monocaryotiques de signes sexuels compatibles. Les souches haploïdes que nous avons employées présentent quatre signes différents: signe(1), A_1B_1, compatible avec A_2B_2, signe(2), A_2B_1, compatible avec A_1B_2, signe (3), A_1B_2 et signe(4), A_2B_2.

2) - Souches utilisées.

La souche sauvage de référence est la souche + iso 10 obtenue par PREVOST (1962). Le signe (1) est le plus utilisé. Certaines souches mutées proviennent de la collection du laboratoire. Divers mutants auxotrophes pour les pyrimidines et tous les mutants résistants aux 5- fluoropyrimidines sont issus de mutagénèses que nous avons effectuées sur la souche + iso 10.

Dans la partie physiologique de ce travail, le choix des souches mutées a été guidé par le souci d'obtenir des résultats compatibles entre eux et avec ceux obtenus avec la souche sauvage: parmi les divers mutants d'un même locus nous avons donc choisi celui dont

Tableau I

LISTE DES SOUCHES HAPLOIDES

n° dans la collection	désignation	génotype	phénotype	origine
2001	+ iso 10 (1)	+ (A_1 B_1)	(+)	G.P
37	ur16 (4)	ur1a.16	(ur$^-$) CPSase ur$^-$	M.G
55	ur33 (4)	ur1b.33	(ur$^-$) ATCase$^-$ suppresseur de arg5	M.G
13	ur5 (1)	ur1c.5	(ur$^-$) CPSase ur$^-$ ATCase$^-$	G.P
99	ur19 (4)	ur19	(ur$^-$) DHOase$^-$	M.G
65	ur6 (4)	ur4.6	(ur$^-$) DHOdéhase$^-$	G.P.
67	ur20 (1)	ur4.20	(ur$^-$) DHOdéhase$^-$	mutagénèse
76	ur7 (1)	ur7.3	(ur$^-$) OMPPase$^-$	G.P
81	ur40 (1)	ur7.40	(ur$^-$) OMPPase$^-$	mutagénèse N
	ur13 (1)	ur13.13	(ur$^-$) OMP DCase$^-$ tranlocation du chr. VIII sur le chr. III	G.P
87	ur13.22 (1)	ur13.22	(ur$^-$) OMP DCase$^-$	mutagénèse N
513	arg5.11 (1)	arg5.11	(arg$^-$) CPSase arg$^-$	G.P
520	arg3 (1)	arg3.3	(arg$^-$) argininosuccinate lyase$^-$	G.P
787	ad21 (1)	ad21.33	(ad$^-$)	G.P
740	ad9 (1)	ad9.9	(ad$^-$)	G.P
2014	sul6 (2)	arg6.sul6	(arg$^-$ bradytrophe) suppresseur de ur1b	D. C-B
2011	r17 (4)	r17	(+) permet l'utilisation de l'acide orotique par les ur1, 19,4.	croisemen ur5r17 x + iso 10
	r24	r24	" " "	G.P
	col 1 (1)	col 1	mutant morphologique à croissance très réduite	G.P

n° dans la collection	désignation	génotype	phénotype	origine
1000	FUR 0 (1)	FUR 0.1	résistance très élevée aux 5-fluoropyrimidines ; excrétrice	mutagénèse UV
1004	FUR 36 (1)	FUR 0.36	" "	mutagénèse NO_2H
1009	FUR 22 (4)	FUR 0.22	" "	" "
1010	FUR 33 (1)	FUR 0.33	" "	" "
1015	FUR 1 (2)	FUR 0.1	" "	" "
1021	FUR 8 (1)	FUR 8.4	" "	" "
1107	FUR 10 (1)	FUR 10	résistance très élevée aux 5-fluoropyrimidines	mutagénèse UV suivie d'un croisement x + iso 10
1037	FUR 11 (1)	FUR 11.2	résistance aux 5-fluorouracile	mutagénèse NO_2H
1059	FUR 28 (1)	FUR 28.2	résistance à la 5-fluorouridine et à la 5-fluorocytidine	" "
	FUI 4 (3)	FUI 4	résistance élevée à la 5-fluorouridine et à la 5-fluorocytidine excrétrice	mutagénèse NG

TABLEAU I - Nous avons fait figurer dans ce tableau les souches haploïdes portant une seule mutation ; le signe indiqué est celui qui a été le plus utilisé dans ce travail ; signification des initiales :

D. C-B : D. CABET-BUSSON,

M.G. : M. GANS,

G.P. : G. PREVOST

la croissance se rapproche le plus de celle de la souche sauvage. A croissance égale, nous avons préféré le signe (1) afin de nous placer dans les meilleures conditions d'isogénéisation possibles.

Une liste des différentes souches utilisées est présentée dans le tableau I. La nomenclature est celle de PREVOST.

3) - Milieux de culture.

Ce sont les milieux décrits par PREVOST (1962). "Mm" signifie milieu minimum synthétique. Le milieu minimum peut être supplémenté par des métabolites indispensables à la croissance des souches auxotrophes. "M.C" signifie milieu complet; à base de Maltea Moser, d'extrait de crottin et de glucose, ce milieu gélosé permet la croissance de toutes les souches de Coprin. Tous les milieux sont préparés stérilement par autoclavage.

4) - Modes de culture.

Les techniques d'obtention des carpophores puis des thalles monocaryotiques issus des basidiospores sont développées dans la thèse de PREVOST, 1962.

En vue de préparer des extraits enzymatiques les souches sont cultivées en milieu liquide dans des flacons ou exceptionnellement sur milieu Mm gélosé en boîtes de Pétri. Le mode de croissance de la souche + iso 10 sur ces milieux est décrit dans le paragraphe 5.

a) Cultures en milieu synthétique liquide.

L'inoculum nécessaire à l'ensemencement des flacons provient d'une culture sur milieu gélosé. Des thalles de 20 mm de diamètre sont découpés à l'aide de lames de rasoir stériles en fragments de $1mm^3$. Il faut 10 thalles pour ensemencer 500 ml de milieu liquide Mm ou supplémenté contenus dans chaque flacon. Deux ou trois flacons suffisent pour les dosages enzymatiques que nous effectuons. Les flacons sont maintenus à 23°; de l'air comprimé stérile barbotant dans le milieu permet l'oxygénation et l'agitation de la culture. En ce qui concerne la durée, deux types de culture en flacons ont été essayés afin d'établir les conditions optimales.

∝) - Une préculture en milieu liquide pendant 48 à 72 heures est suivie d'une culture dans un milieu liquide neuf durant 14 à 48 heures selon les expériences. Pour passer d'un milieu à l'autre le mycélium est lavé avec le milieu neuf. Il est alors, soit réensemencé dans un volume double de celui du milieu de préculture, soit mixé deux fois 4 secondes ce qui le fragmente et multiplie les inoculums avant le réensemencement. Il était important pour la suite de ce travail de connaître les rendements en protéines et en activités enzymatiques de ces différents types de culture.

flacon numéro	taille de l'inoculum	mixage	protéines récoltées (mg)	activités spécifiques ATCase	DHOase
1	triple	non	21,4	260	1.150
2	simple	non	14,1	590	1.430
3	simple	non	14,6	570	1.690
4	simple	2 x 4"	31,6	190	1.260

Tableau 2

Variation des activités enzymatiques et de la teneur en protéines chez + iso 10 en fonction des conditions de culture.

(Pour ensemencer les flacons numérotés de 1 à 4 une préculture de 3 flacons âgée de 70 heures a été utilisée. La culture proprement dite a été récoltée 40 heures après le réensemencement. Les activités ATCase et DHOase sont exprimées en nanomoles d'acide uréido-succinique formé par mg de protéines et par heure. Il s'agit d'un extrait brut.

Les résultats consignés dans le tableau 2 permettent de préciser les conditions de culture optimales: le mixage, bien que favorable à une récolte importante de protéines, est accompagné d'une activité spécifique très faible de l'ATCase; les petits inoculums correspondent à des activités spécifiques plus élevées que celles obtenues avec un inoculum important. Nous avons donc supprimé le mixage et les inoculums

abondants de nos cultures. Toutefois la technique de mixage, à condition d'être modifiée afin d'obtenir des activités enzymatiques plus élevées, mériterait d'être retenue pour fournir de grandes quantités de protéines.

β) - Des cultures simples, non précédées d'une préculture, fournissent de meilleurs résultats en protéines et en activités spécifiques. Des expériences de mesure des activités enzymatiques en fonction du temps (M.L. HIRSCH, résultats non publiés)* nous ont amené à fixer la durée des cultures à 43 h. Ces conditions de culture: 43h sur milieu Mm liquide ont été appelées "conditions standard".

b) Cultures en milieu synthétique gélosé.

Des boîtes de Pétri contenant 30ml d'un milieu gélosé recouvert d'une rondelle de cellophane stérile sont ensemencées. Les inoculums sont des fragments cylindriques de $1mm^3$ prélevés à l'aide d'un emporte-pièce à la périphérie des thalles d'une culture préexistante. Les boîtes de culture sont placées à l'obscurité dans une étuve à 23°. Dans ces conditions, le mycélium se développe à la surface de la cellophane sous forme de thalles circulaires (5 par boîte) dont le diamètre atteint 20mm en 4 jours.

Les thalles peuvent être transplantés sans dommage d'une boîte de Pétri à l'autre grâce à la rondelle de cellophane qui les supporte.

Cette technique permet de faire varier aisément la composition du milieu de culture en vue d'étudier la régulation d'activités enzymatiques par des métabolites exogènes. Par ce procédé on peut également recueillir et analyser les produits que certains mutants excrètent dans le milieu; on peut aussi par transplantation de la culture sur cellophane, mettre des thalles au contact de pyrimidines radioactives pendant des temps déterminés afin d'étudier le métabolisme des pyrimidines exogènes.

Il faut signaler que ce type de culture présente l'inconvénient de fournir des activités spécifiques beaucoup plus faibles que les cultures en milieu liquide; l'ATCase est particulièrement affectée.

* Entre 38 et 48 h de culture les activités spécifiques des enzymes que nous dosons sont stables; elles diminuent au-delà de 48 heures.

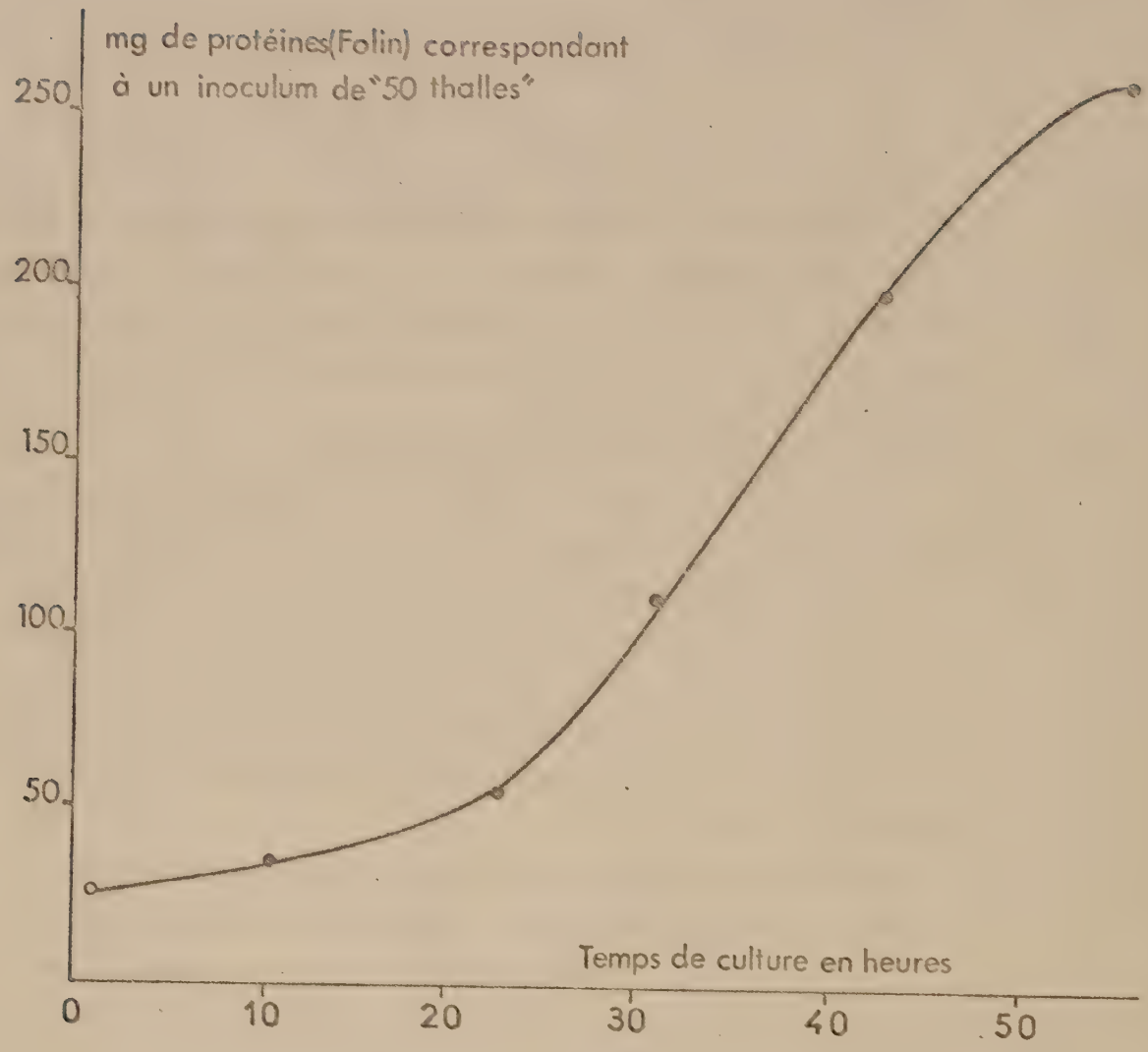


Figure 2 - Croissance de la souche + iso 10 (1) en milieu minimum liquide.

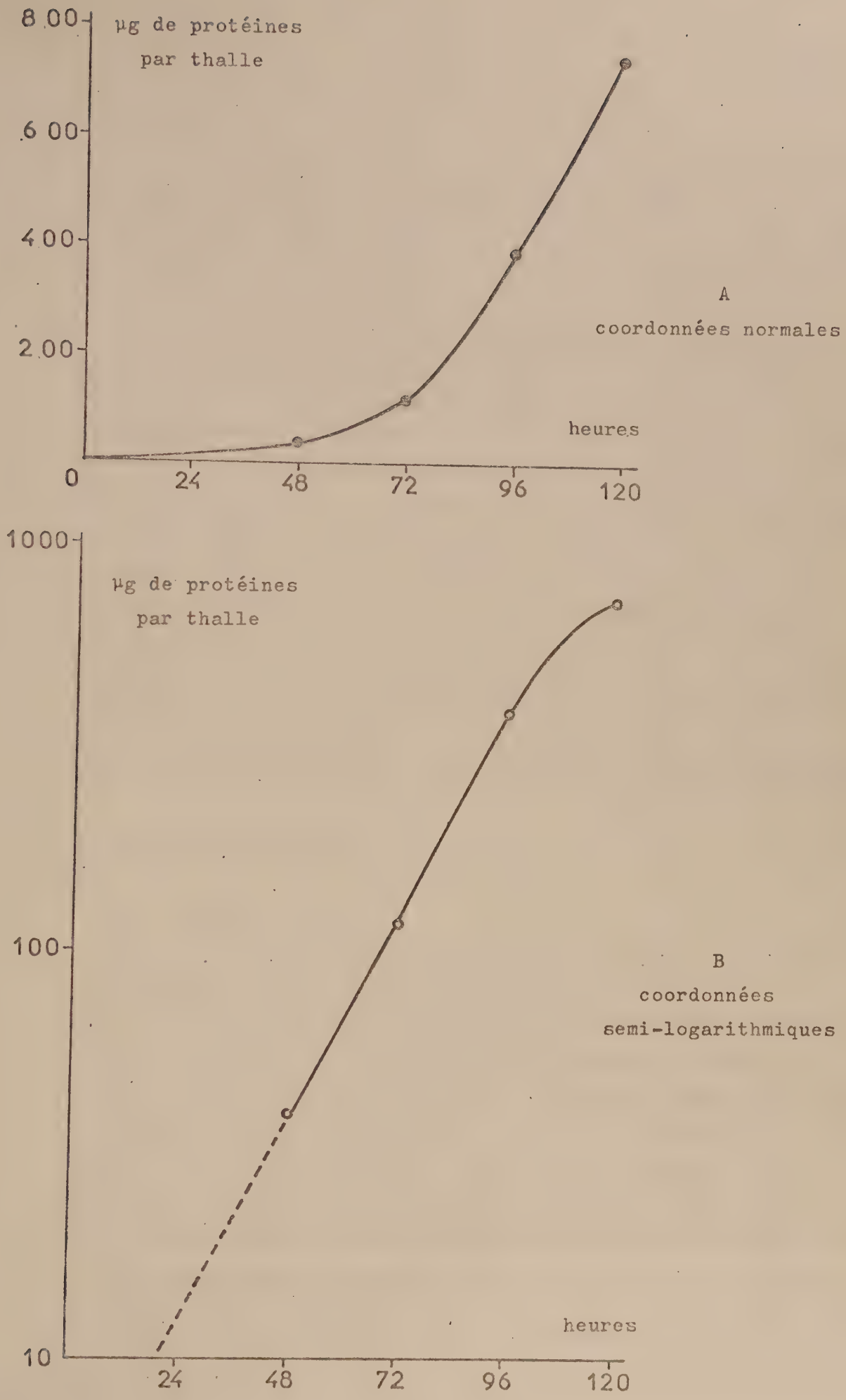


Figure 3 - Croissance de la souche + iso 10 sur milieu minimum solide.

Des enzymes protéolytiques très actifs dans les cultures sur milieu solide pourraient être en cause.

3) - Croissance

En milieu liquide,un inoculum donne naissance à des hyphes qui se développent activement dans toutes les directions de l'espace, formant ainsi une boule de mycélium. Dans ces conditions le temps de doublement est de 12 heures environ au moment de la récolte (figure 2).

Sur milieu solide,un inoculum développe des hyphes à la surface du milieu de culture: il se forme un thalle circulaire au niveau duquel le milieu s'épuise en éléments nutritifs. La croissance devient rapidement hétérogène au sein du thalle car seuls les hyphes périphériques bénéficient d'un apport nutritif suffisant. Les hyphes situés en position centrale ont probablement un métabolisme réduit: F. PREVOST (com. pers.) a montré par autoradiographie que seules les extrémités apicales des hyphes incorporent activement l'uracile ^{14}C. La croissance est plus lente qu'en milieu liquide et le temps de doublement moyen des protéines d'un thalle est de 17 heures (figure 3).

B - TECHNIQUES GENETIQUES.

1) - Mutagénèse.

Les traitements mutagènes utilisés sont l'irradiation aux rayons ultra-violets et l'action de l'acide nitreux suivant le protocole décrit par PREVOST (1962). La traitement à la nitrosoguanidine a été appliqué à des basidiospores issus du croisement + iso 10 (1) x + iso 10 (4). Les spores sont incubées à 37° pendant deux heures dans de l'extrait de crottin stérile additionné de nitrosoguanidine à la concentration de 10 µg/ml. Elles sont ensuite lavées avec du milieu Mm liquide, dénombrées à l'hématimètre puis ensemencées sur M.C à raison d'environ 600 spores par boîte de Pétri (4 à 5% des spores survivent

2) - Sélection des mutants

Pour les mutants résistants aux 5 fluoropyrimidines la sélection est positive: les hyphes mycéliens ou les spores traités sont

repiqués sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Mm + une 5-fluoropyrimidine; les souches mutées résistantes sont les seules qui soient susceptibles de croître. Ces souches sont repiquées deux fois sur le milieu sélectif* pour vérifier leur stabilité avant d'entreprendre leur étude génétique et enzymologique.

Dans le cas de mutants auxotrophes les cellules traitées par l'agent mutagène sont placées sur milieu minimum gélosé + pyrimidines ce qui élimine les auxotrophes autres que les pyrimidines exigeants (ur^-). Les thalles obtenus sont répliqués sur milieu Mm et sur milieu Mm + pyrimidine (uracile 2.10^{-4} M + uridine 2.10^{-4}M). Les souches incapables de croître sur Mm mais supplémentables par les pyrimidines sont repérées. Leur auxotrophie pour les pyrimidines est vérifiée deux fois au moyen de répliques* avant que ces souches ne soient étudiées.

3) - Analyse génétique.

L'analyse des tétrades ou des spores en vrac, la détermination du monogénisme et celle de l'allèlisme, la localisation génétique ont été menées selon les principes exposés par PREVOST (1962).

C - TECHNIQUES ENZYMOLOGIQUES

1) - Récolte des mycéliums.

Les thalles sont retenus par filtration s'il s'agit d'une culture en milieu liquide, prélevés à l'aide d'une spatule s'il s'agit d'une culture sur milieu solide. Ils sont lavés deux fois 10 minutes dans du tampon phosphate M/4 pH 7,5 à 4°C. Ayant perdu une partie de leur eau par osmose, les thalles sont alors tassés et essorés au fond d'un tube au moyen de plusieurs épaisseurs de ouate de cellulose (Kleenex). Ce "culot" de mycélium est utilisé pour la préparation de l'extrait enzymatique.

2) - Préparation de l'extrait enzymatique.

L'extrait peut être préparé à partir de mycélium fraîchement récolté ou de mycélium congelé à -80°.

* Ces repiquages ou ces répliques sont précédés d'un passage sur milieu complet.

Le mycélium congelé est broyé au moyen d'une hélice ultra-Turrax. L'homogénat obtenu est centrifugé 30 minutes à 13.000 x g à 4°C. On élimine le culot formé de débris cellulaires, noyaux et mitochondries.

Le surnageant ou "extrait brut" est débarrassé des petites molécules par filtration sur gel de dextrane à 4°C dans du tampon phosphate disodique monopotassique M/8 pH 7,5. On dépose 1,5ml d'extrait brut sur une colonne de Sephadex G25 (100 mm x 10 mm). La fraction protéique de l'effluent est répérée à l'aide d'un appareil enregistreur émettant dans l'U.V (Uvicord) et recueillie. La fraction contenant les petites molécules telles que pyrimidines, nucléotides, produits intermédiaires de la biosynthèse de l'UMP susceptibles d'interférer avec les dosages enzymatiques est éliminée. La fraction protéique ou "extrait séphadexé" est utilisée immédiatement pour les dosages. Ce procédé permet d'obtenir des activités spécifiques plus élevées (voir tableau 3.) et une meilleure proportionalité entre la quantité de produit formé et la concentration en protéines utilisée.

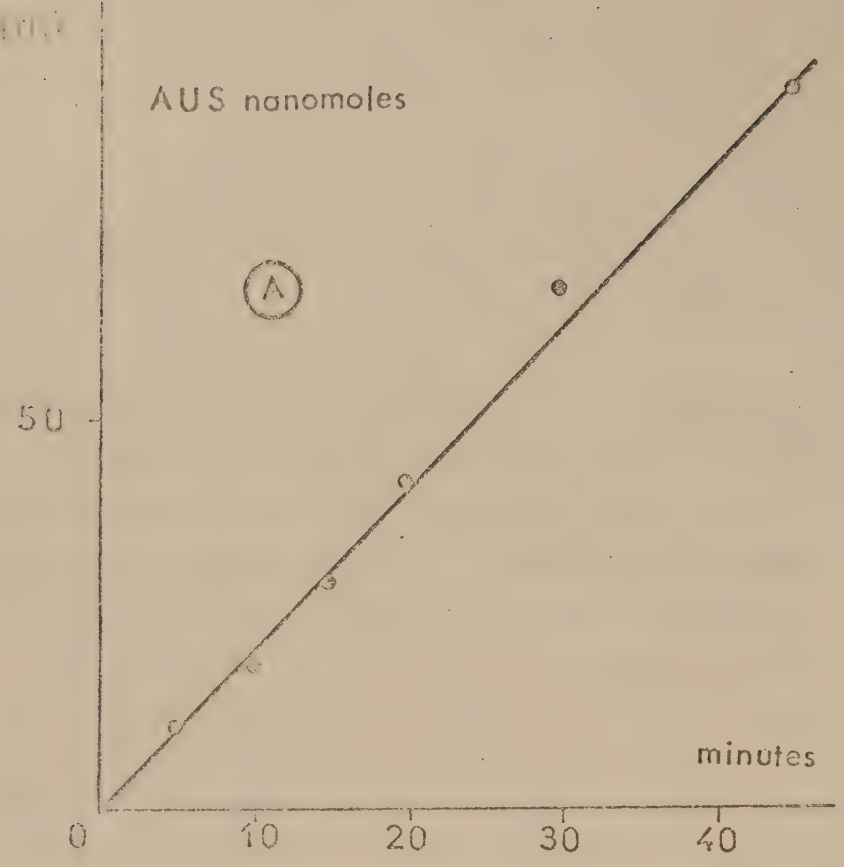
	Activité spécifique	
enzyme	extrait brut	extrait sephadexé
ATCase	1.300	4.800
DHOase	2.000	3.900
OTCase	600	2.200

Tableau 3

Comparaison entre les activités spécifiques d'un "extrait brut" et d'un "extrait sephadexé".

Extraits préparés à partir de mycélium frais + iso 10 (1)
Activités en nanomoles d'AUS ou de citrulline formées/mg protéines/heure.

Le mycélium frais est broyé dans un mortier en présence de son propre poids de sable et de 1,5ml de tampon phosphate M/8 pH 7,5



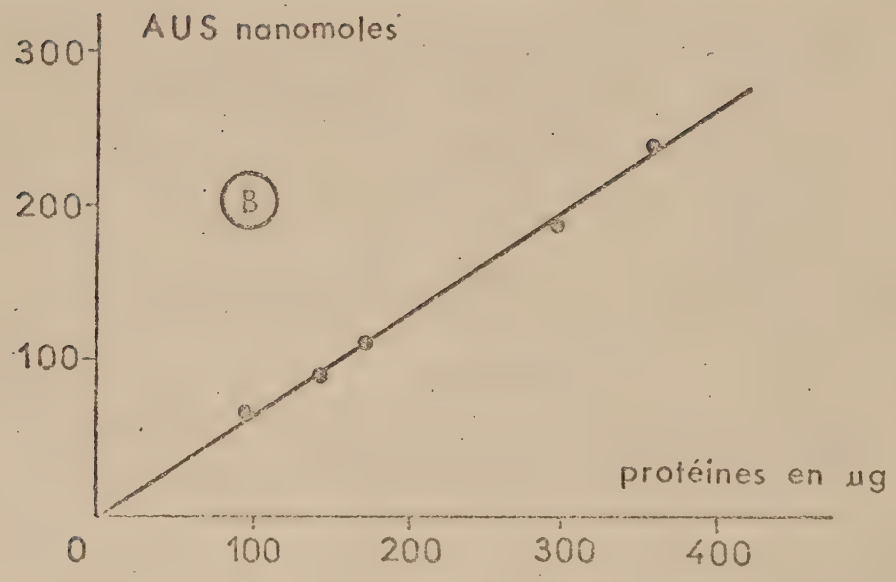


Figure 4 - Dosage de l'aspartate transcarbamylase : formation d'acide uréidosuccinique (A U S)

A - en fonction du temps d'incubation (quantité de protéines 10
B - en fonction de la quantité de protéines (30mn d'incubation)

L'extrait enzymatique provient de la souche + isc 10 (1) ; (mycélium conge

pour un flacon de culture. La suite de l'extraction est conduite de la même manière qu'à partir de mycélium congelé.

3) - Techniques de dosage.

Nous n'avons pas modifié les techniques adaptées au Coprin par PREVOST (1966) pour l'ATCase, la DHOase, la DHOdéhase et l'OTCase.

1 - Dosage de l'aspartate transcarbamylase (ATCase) (2.1.3.2)

L'ATCase catalyse la réaction

carbamyl-phosphate + L-aspartate ⟶ L-uréidosuccinate + Pi .

L'activité de l'enzyme est évaluée par la quantité d'uréidosuccinate formé selon la méthode de KORITZ et COHEN (1954) modifiée par GERHART et PARDEE (1962.

Le mélange réactionnel comporte pour un tube :

Tampon Tris pH8	200 micromoles
aspartate de sodium pH7	18,8 micromoles
carbamyl-phosphate de lithium	2 micromoles

sous un volume de 0,55ml.

Les doses d'extrait comportent 50, 100 et 150µg de protéines pour le matériel congelé et 30, 60, 80µg de protéines quand l'extrait provient de mycélium frais (en raison de la cryosensibilité de l'ATCase).

Pour chaque dose, deux tubes réactionnels et un tube témoin (sans aspartate) sont préparés. L'activité spécifique calculée est la moyenne de quatre ou de six activités spécifiques. L'incubation dure 30 minutes à 28°C. La réaction est arrêtée par le froid. La quantité d'AUS formé est mesurée aussitôt. Cette quantité est proportionnelle au temps d'incubation et à la dose de protéines (fig. 4). Le Km pour l'aspartate est 3.10^{-2}M et le Km pour le carbamylphosphate 10^{-3}M (TANAY-CALLEN, résultats non publiés).

La technique de dosage de l'OTCase est très voisine de la précédente. Le mélange réactionnel contient 3,75 micromoles d'ornithine au lieu d'aspartate. Les doses d'extrait comportent 20, 40 et 60ug de protéines. L'activité est mesurée par la quantité de citrulline formée (dosage d'ARCHIBALD, 1944).

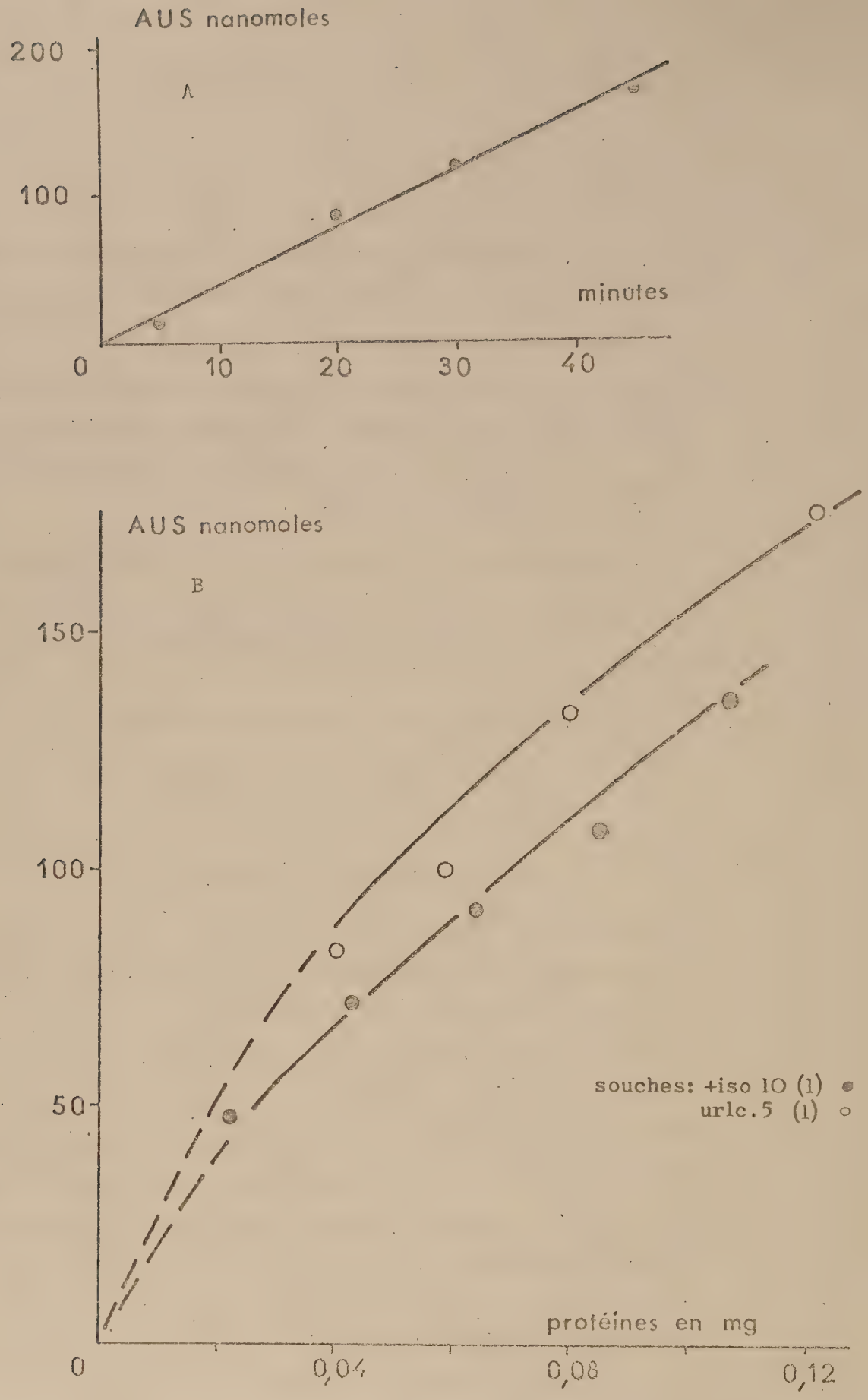


Figure 5 - Dosage de la dihydroorotase : formation d'acide uréidosuccinique (A U S)

A - en fonction du temps d'incubation (quantité de protéines 60µ
B - en fonction de la quantité de protéines (25mn d'incubation)
Les extraits enzymatiques provenant de souches + iso 10 et urlc.5 ont été filtrés sur colonne de Séphadex G25.

2) - Dosage de la dihydroorotase (DHOase) (3.5.2.3).

Cet enzyme catalyse la cyclisation de l'acide uréïdo-succinique (AUS) en acide dihydro-orotique.

L-uréidosuccinate ⟶ L-dihydroorotate + H_2O

Le dosage est effectué en sens inverse de la réaction de biosynthèse. L'activité de l'extrait est évaluée en mesutant la quantité d'AUS formé (dosage d'Archibald)

Le mélange réactionnel pour un tube (vol: 0,55ml) contient

Tampon Tris pH8 : 200 micromoles

acide dihydro-orotique : 0,32 micromoles

Les doses d'extrait enzymatique contiennent 30, 60 et 90µg de protéines. Pour chaque dose, on prépare deux tubes réactionnels et un tube témoin sans substrat.

La suite du dosage est effectuée selon le même protocole que pour l'ATCase. La quantité d'acide uréïdo-succinique produite est proportionnelle au temps d'incubation (fig.5A). La quantité d'acide uréïdo-succinique formée en fonction de la quantité de protéine ne fournit pas le même type de courbe (fig.5B): on observe une décroissance d'activité spécifique chez toutes les souches étudiées. Cette diminution d'activité pourrait provenir d'une disparition du substrat; en augmentant la dose d'extrait on augmente en même temps la quantité de dihydro orotate déshydrogénase (DHO déhase) qui transforme l'acide dihydro-orotique (DHO) en acide orotique (AO). Cette hypothèse est peu vraisemblable car les extraits de souche dépourvue d'activité DHO déhase fournissent le même genre de résultats . Un inhibiteur présent dans tous les extraits pourrait être en cause. Pour minimiser cet inconvénient et obtenir des résultats comparables, nous utilisons des quantités de protéines identiques pour tous les dosages. Les résultats présentés sont la moyenne des résultats obtenus avec trois concentrations différentes de protéines.

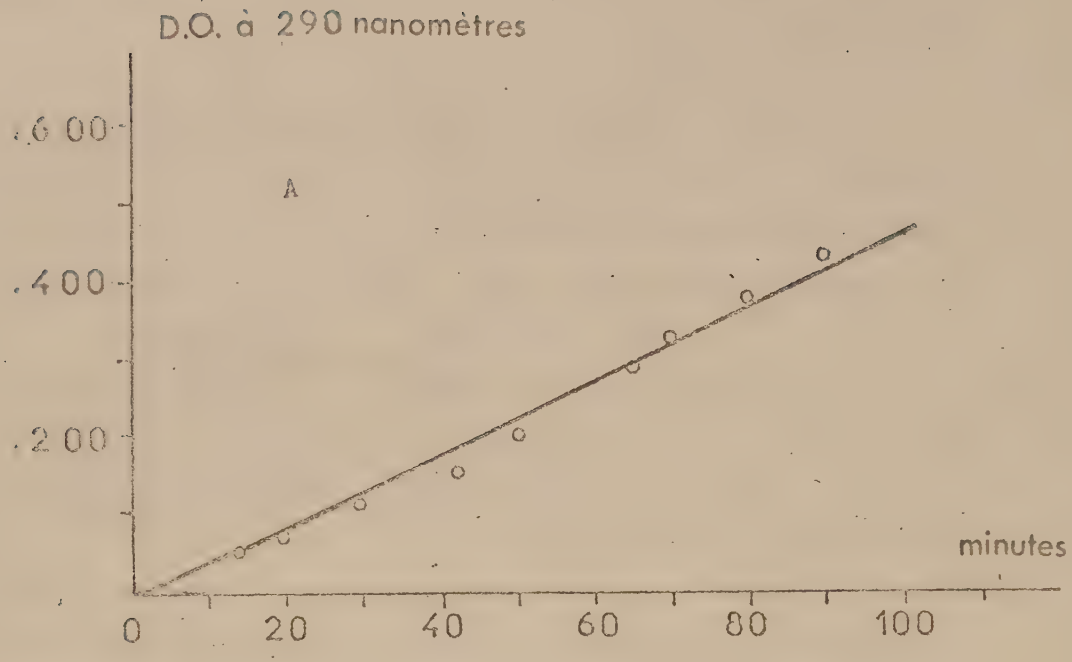
3) - Dosage de la dihydroorotate deshydrogénase (DHO déhase) (1.3.3.1)

La DHO déhase catalyse la formation de l'acide orotique

dihydro-orotate ⟶ orotate

? + NAD ? + NADH + H^+

? + 1/2 O_2 ? + H_2O



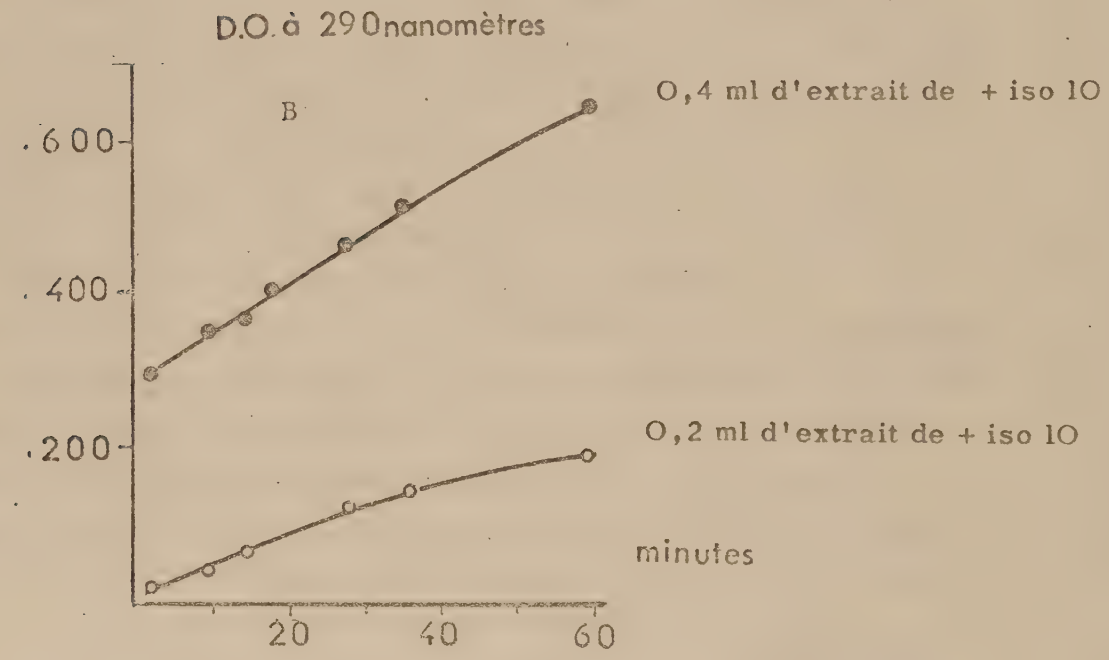


Figure 6 - Dosage de la dihydroorotate deshydrogénase

Formation d'acide orotique mesurée par l'accroissement de densité optique du mélange réactionnel à 290 nmètres
A - en fonction du temps d'incubation
B - avec 2 concentrations de protéines
(dans les 2 cas, le témoin sans substrat comporte O,2 ml d'extrait)

On connaît deux enzymes susceptibles de catalyser la formation de l'orotate à partir du dihydroorotate: l'un biosynthétique, utilise l'oxygène de l'air comme accepteur d'électrons; l'autre est catabolique, les pyridines- nucléotides jouant le rôle d'accepteur d'électrons Les deux coexistent chez Pseudomonas (TAYLOR, W.H., M.L. TAYLOR, D.F. EAMES, 1966).

Chez le Coprin la présence de NAD, de NADP ou de $Fe(CN)_6K_4$ne provoque pas la réaction. L'enzyme en cause serait donc, comme chez Neurospora (EAKIN et MITCHELL, 1969) une dihydroorotate oxydase.

La méthode de BECKWITH et coll. (1962) modifiée par LACROUTE (1966) a été essayée. Le 2.6. dichloro-phénol indophénol (2.6.DCIP) accèlère la réaction mais celle-ci a lieu sans l'intervention d'un accepteur

Le mélange réactionnel est formé de :

Tampon Tris pH8	300 umoles
2.6 DCIP (facultatif)	0,3 umoles
acide dihydroorotique neutralisé par NaOH	3,2 umoles
H_2O distillée q.s.p.	3 ml

La réaction commence avec l'adjonction de l'extrait enzymatique, 200 à 500 ug de protéines. La quantité d'acide dihydroorotique oxydé est mesurée par l'accroissement de la densité optique de la cuve réactionnelle à 28°C. La lecture à 290 nanomètres se fait contre un blanc sans substrat.

La quantité d'acide orotique formée est proportionnelle au temps d'incubation (fig.6A.). Par rapport à la dose de protéines, les essais de proportionnalité sont assez satisfaisants.(fig. 6B).

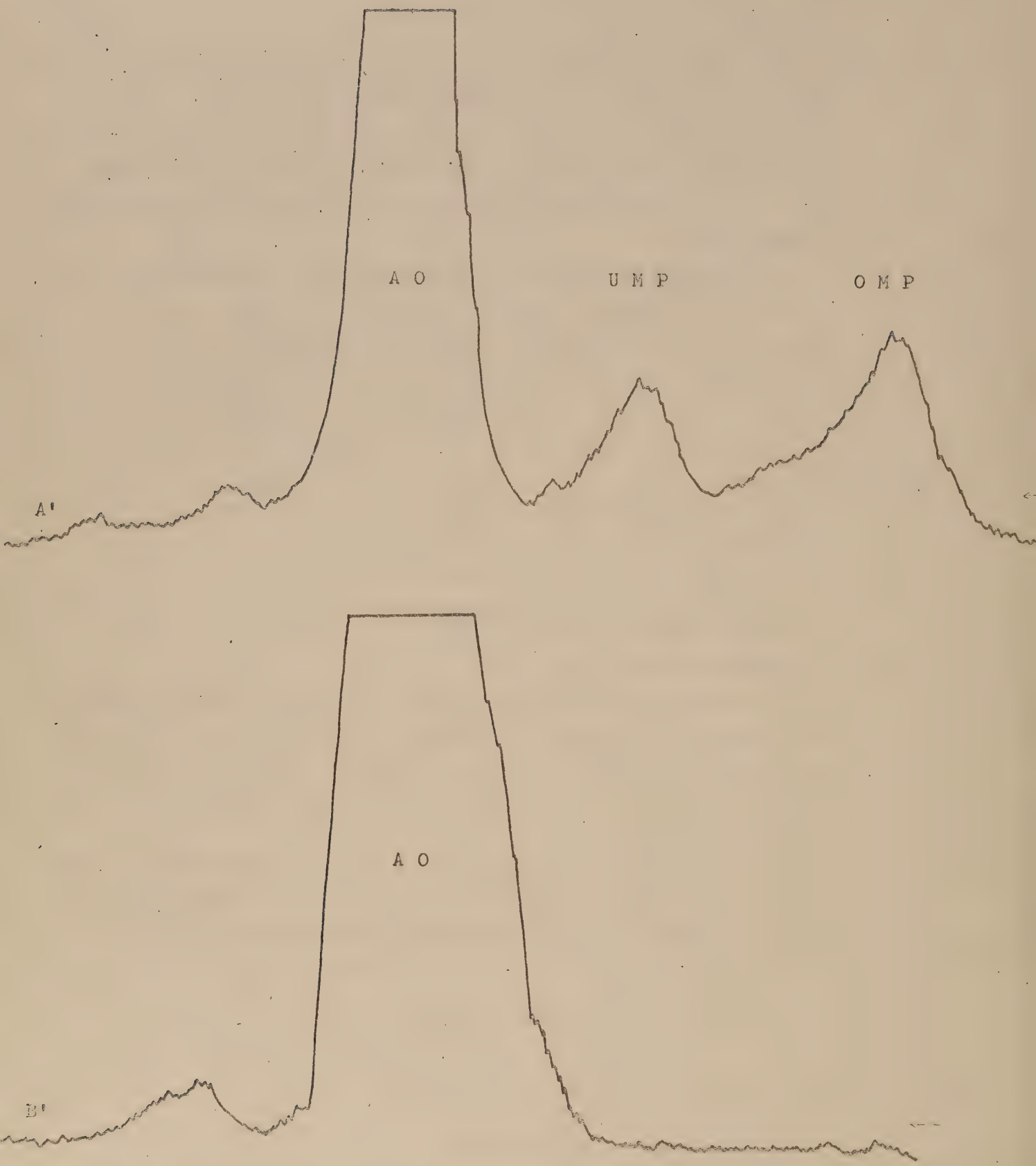
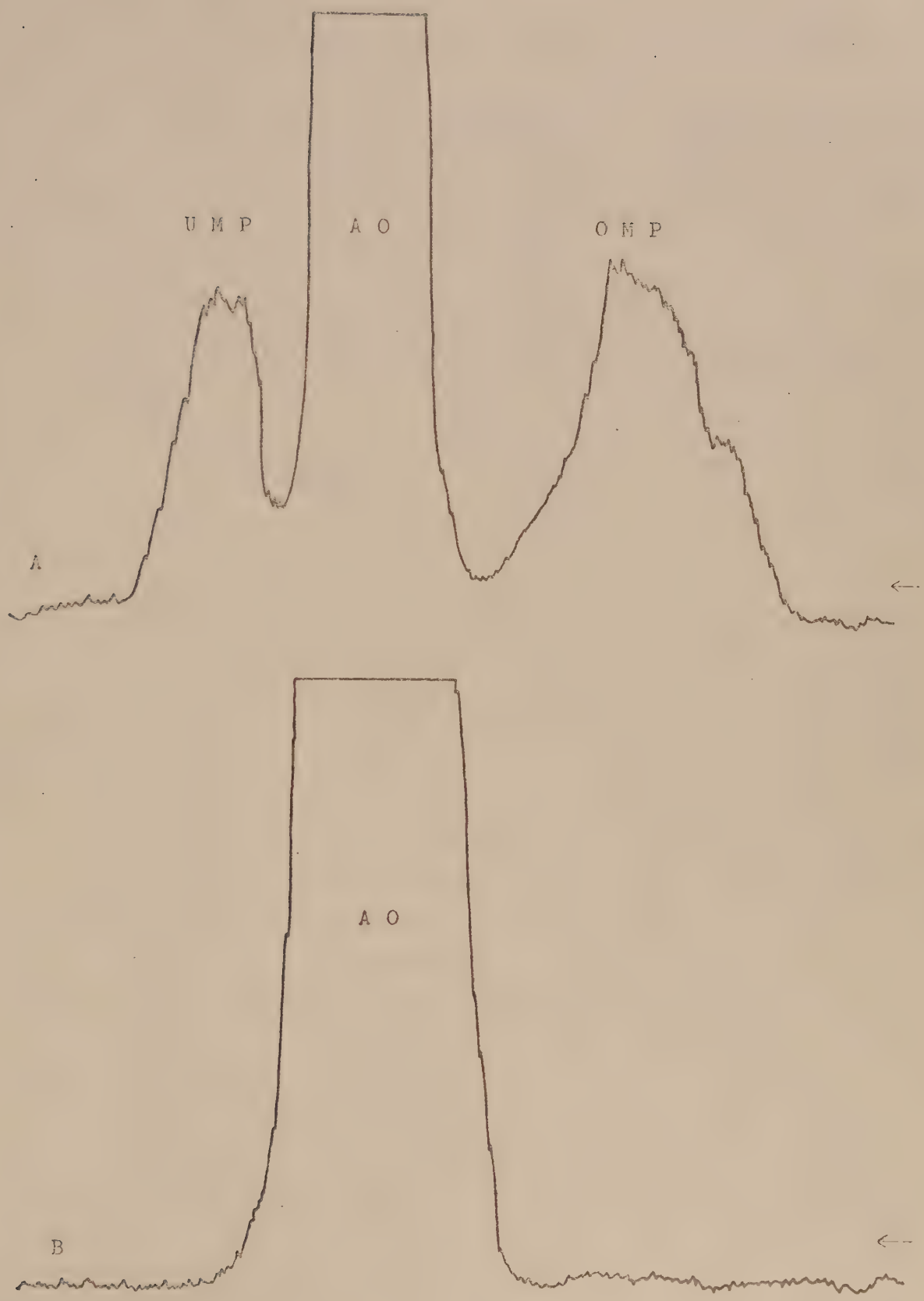


Figure 7c – Dosage de l'orotidine-5'-phosphate pyrophosphorylase

radiochromatogrammes : A' - mélange réactionnel (extrait + iso 1C
B' - témoin sans extrait, avec PRPP
solvant : butanol-acide acétique-eau ; la flèche indique le sens de migration du solvant.



suite Figure 7d - Dosage de l'orotidine-5'-phosphate pyrophosphorylase

radiochromatogrammes : A - mélange réactionnel
B - témoin sans PRPP
solvant : gradient de formiate d'ammonium.

4) - Dosage de l'orotidine-5'-phosphate pyrophosphorylase (OMPPase)(2.4.2.10

L'orotidine-5'-phosphate pyrophosphorylase catalyse la réaction de l'orotate avec le ribosylpyrophosphate-5-phosphate (PRPP) qui permet la formation de l'orotidine-5'-phosphate :

orotate + PRPP ⟶ orotidine-5-phosphate + PP

Le dosage a d'abord été effectué selon la méthode spectrophotométrique de AMES, MARTIN, GARY (1961). La cuve réactionnelle contient

Tampon Tris pH8	:	250 micromoles
orotate (neutralisé par NaOH)	:	0,25 micromoles
Cl_2Mg :		1 micromole
PRPP :		4 micromoles
H_2O : q.s.p.		3ml

Les doses d'extrait enzymatique apportent 1 à 3,5mg de protéines. La réaction commence avec l'adjonction de PRPP. La disparition de l'acide orotique est suivie par la décroissance de densité optique à 295 nanomètres de la cuve réactionnelle lue contre une cuve témoin dépourvue d'acide orotique. L'absorption par les protéines est très élevée à cette longueur d'onde ce qui rend difficile une évaluation précise de la disparition du substrat. Nous avons donc mis au point une autre technique utilisant l'acide orotique ^{14}C-2 comme substrat. Le mélange réactionnel pour un tube (0,5ml) contient :

orotate ^{14}C-2 : 0,45µmoles
Tampon Tris pH8 : 46 micromoles
Cl_2Mg : 2,4 micromoles
glutathion : 1,7 micromoles
PRPP : 12 micromoles.

Les doses d'extrait enzymatique apportent 20 à 100 µg de protéines. L'incubation dure 30 minutes à 28°. La réaction est arrêtée par 0,01ml d'acide perchlorique pur. Après 15 minutes d'ébullition, les tubes réactionnels et les tubes témoins (contenant un extrait bouilli) sont neutralisés par de la potasse puis centrifugés pour éliminer le précipité de protéines et de perchlorate de potassium. Le surnageant limpide est chromatographié sur du papier Whatman 1 dans un mélange

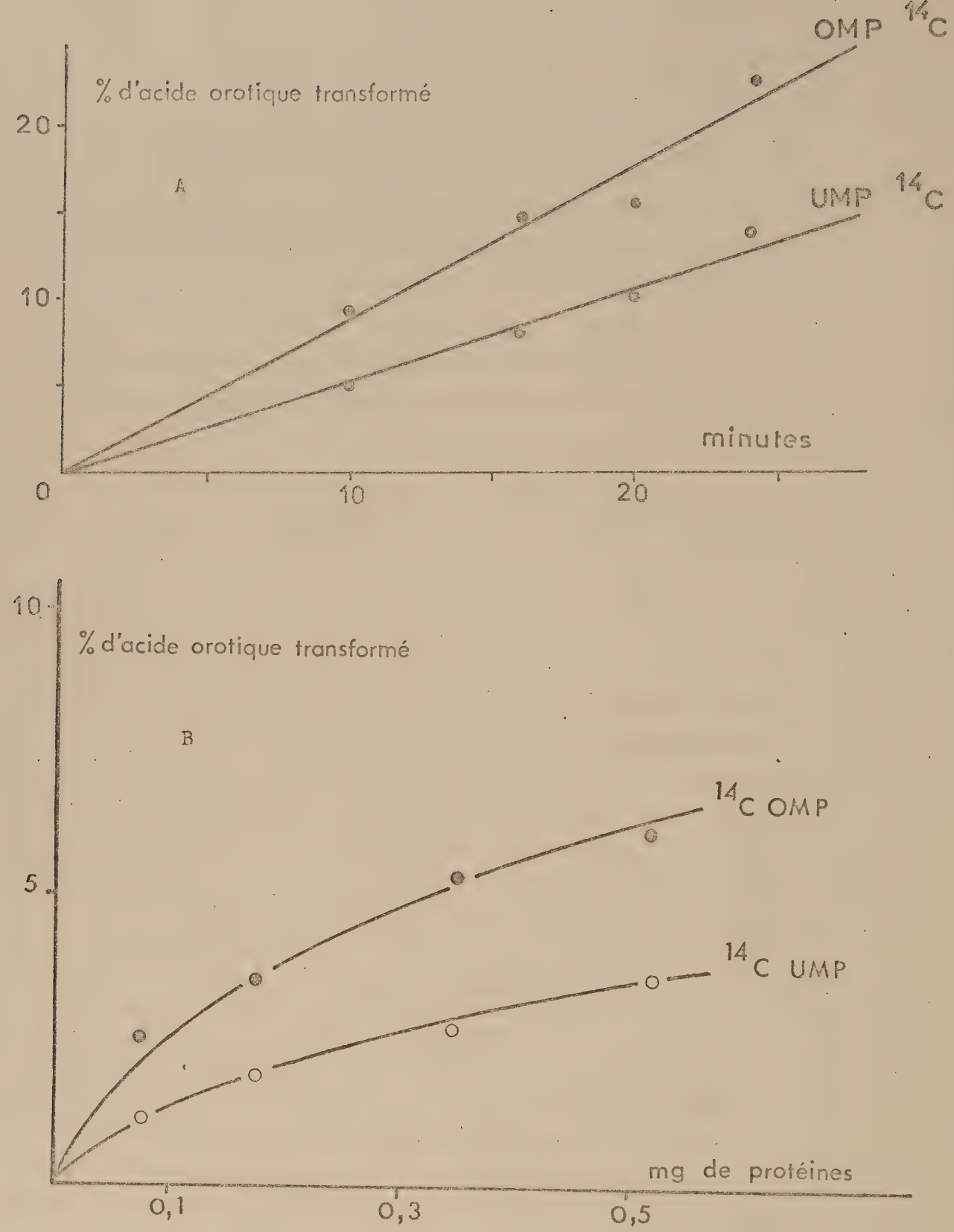


Figure 7 - Dosage de l'orotidine-5'-phosphate pyrophosphorylase

formation d'OMP et d'UMP : A - en fonction du temps d'incubation (quantité de protéines 0,48mg)
B - en fonction de la quantité de protéines (incubation 10mn)

L'extrait enzymatique provient d'une souche + iso 10 cultivée en milieu minimum liquide (conditions standard), (mycélium congelé).

butanol-acide acétique-eau (5:2:3) ou dans un gradient de formiate d'ammonium 0,2M à 4M à pH 6,2 (AXELOOS et PEAUD-LENOEL, 1966) avec des produits traceurs non radioactifs (uridine, orotidine, acide orotique, OMP, UMP). Les taches de pyrimidines sont répérées grâce à leur absorption en U.V., leur radioactivité est évaluée au moyen d'un passeur de radio-chromatogramme (Tracerlab 4 scanner). (figure 7 C et D).

L'apparition d'OMP et d'UMP radioactives est proportionnelle au temps d'incubation (fig. 7A). L'activité spécifique diminue quand la dose de protéines augmente (fig. 7B). Cette situation a été observée pour des extraits de cellules humaines malgré un traitement préalable des extraits par dialyse (PINSKY et KROOTH, 1967).

5) Dosage de l'orotidine-5'-phosphate décarboxylase (OMP DCase) (4.1.1.23)

Cet enzyme catalyse la décarboxylation de l'orotidine-5'-phosphate en uridine-5'-phosphate.

$$OMP \longrightarrow UMP + CO_2$$

Les premiers dosages ont été faits selon la méthode spectrophotométrique de BECKWITH et coll. (1962) modifiée par PREVOST (1966).

Le mélange réactionnel comporte pour une cuve :

Tampon Tris pH8 : 300 µmoles

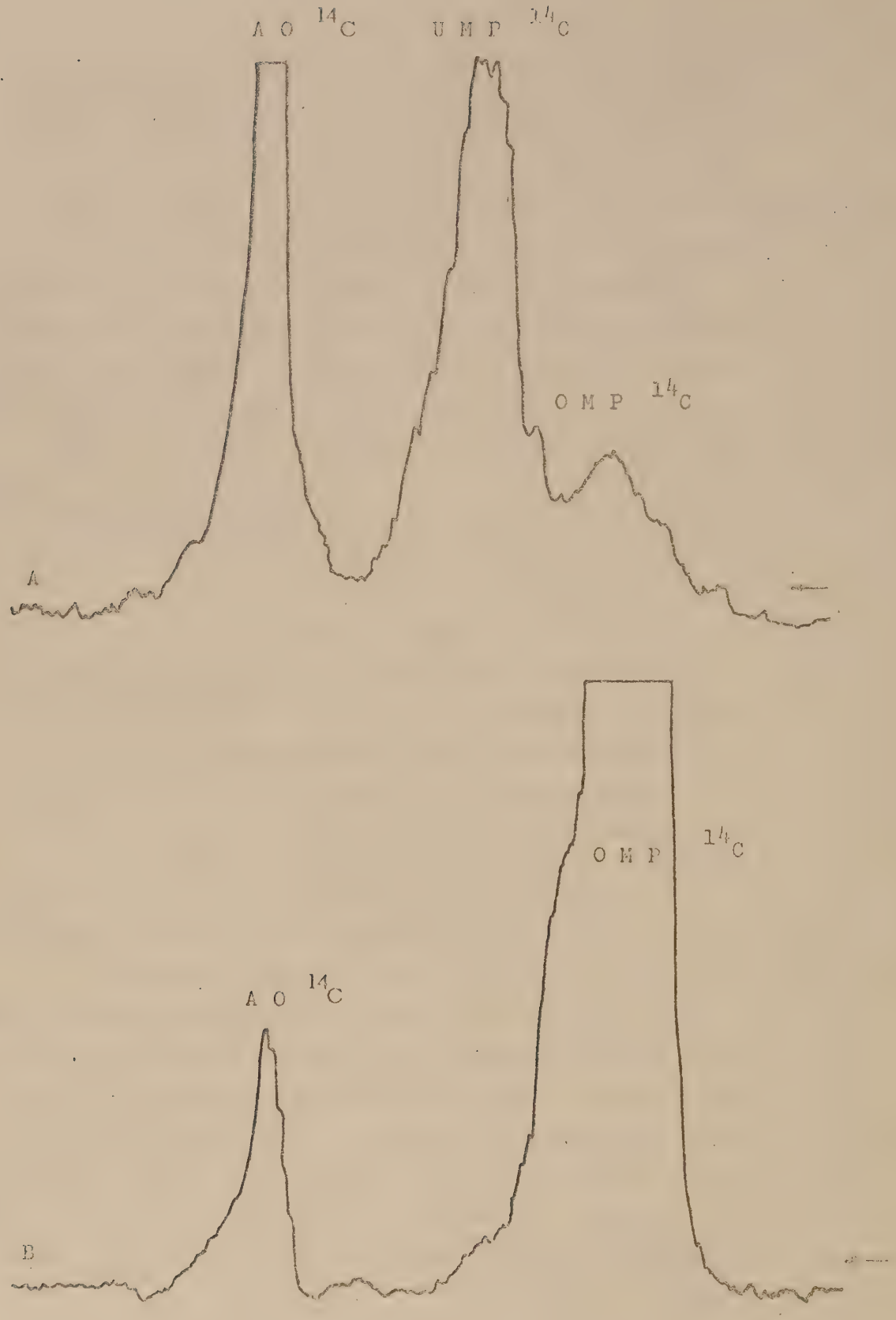
Pyridoxal phosphate 0,32 µmoles

OMP : 0,223 µmoles, H_2O q.s.p. 3ml

On mesure la quantité d'OMP décarboxylée par la diminution de densité optique de la cuve réactionnelle à 285 nanomètres à 28°C. La lecture est faite contre un témoin sans substrat.

Le substrat, OMP, a cessé d'être distribué dans le commerce peu de temps après le début de notre travail. Nous avons alors entrepris la fabrication de ^{14}C-2 OMP à partir d'acide orotique ^{14}C-2 et d'un extrait enzymatique de mutant ur 13 (dépourvu d'OMP DCase). En éluant les taches d'OMP à partir d'un chromatogramme (butanol- acide acétique-eau: voir dosage de l'OMPPase) nous avons obtenu par lyophilisation de l'OMP cristallisée. Cette préparation a permis d'effectuer quelques dosages (ex. fig.8). Au total le dosage de l'OMP DCase a été pratiqué moins souvent que celui des autres enzymes étudiés au cours de ce travail.

La décarboxylation de l'OMP est proportionnelle au temps d'incubation (fig.9A). Le chlorure de magnésium ne modifie pas la vitesse de la réaction. Le nombre peu élevé d'expériences effectuées



par voie enzymatique à partir d'un extrait de OMP DCase⁻) comme substrat pour doser l'OMP décarboxylase.

tracés de radiochromatogrammes : A - mélange réactionnel après 30mn d'incubation
B - témoin (temps 0)(l'OMP n'est pas pure)

solvant : butanol-CH_3COOH-H_2O

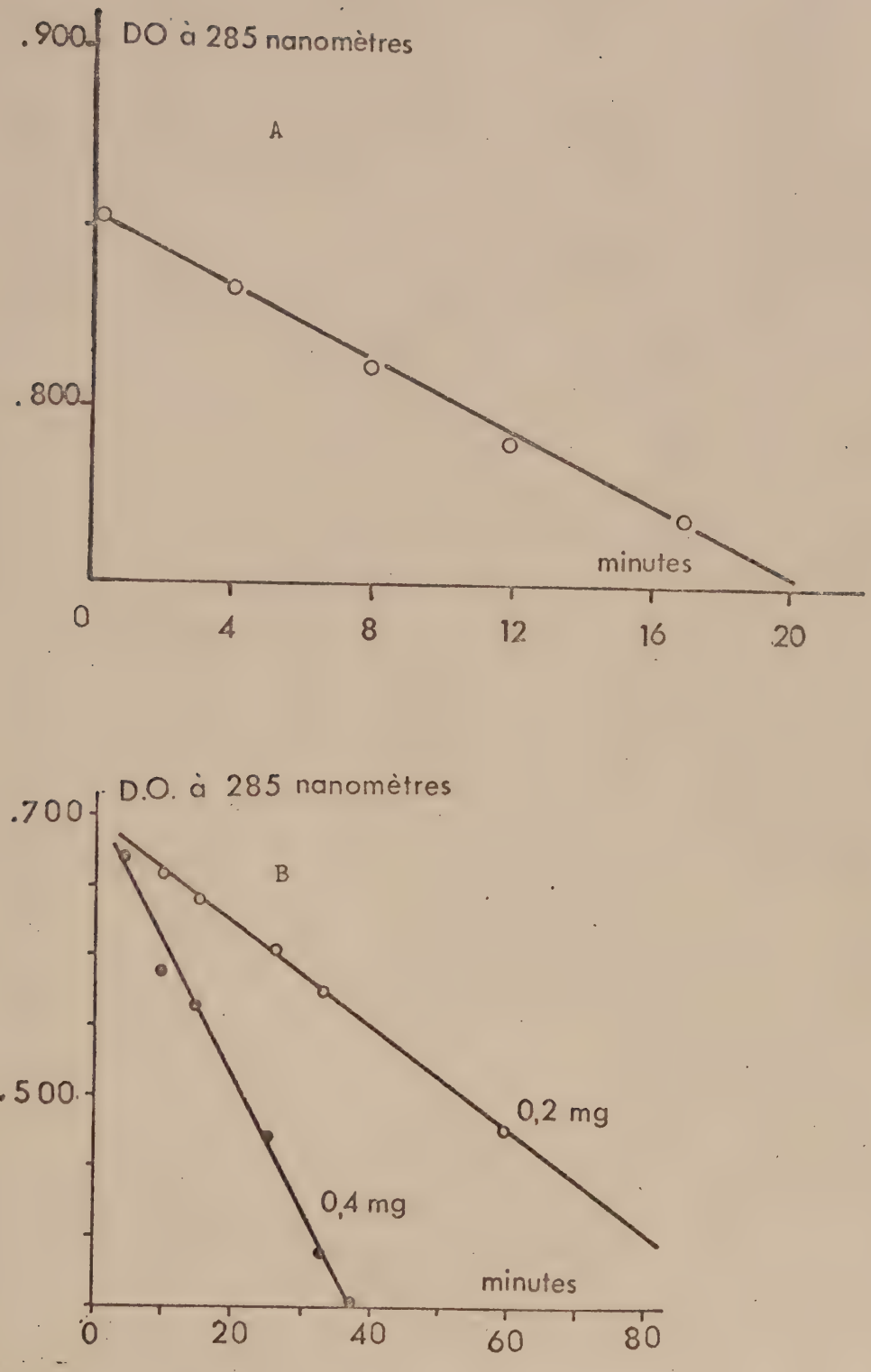


Figure 9 - Dosage de l'orotidine-5'-phosphate décarboxylase

disparition de l'OMP mesurée par la diminution de densité optique du mélange réactionnel à 285 nmètres
A - en fonction du temps d'incubation
B - avec 2 concentrations de protéines

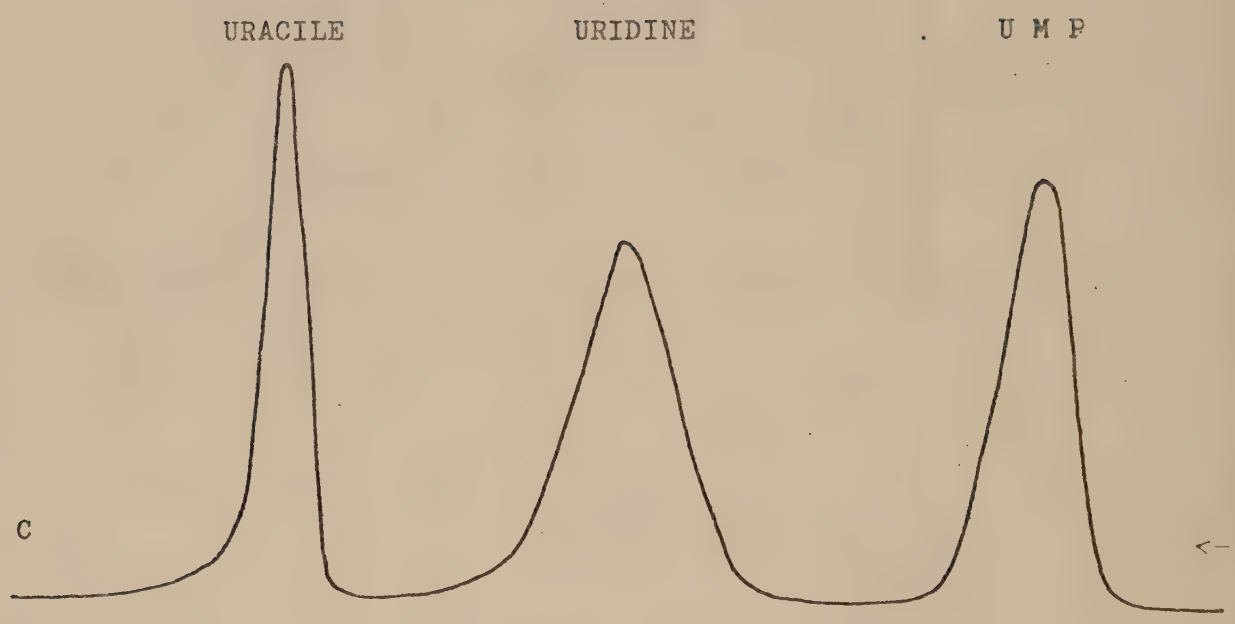


Figure 10 - radiochromatogrammes : C-mélange témoin [UMP ^{14}C, uridine ^{14}C, uracile ^{14}C, (C.E.A.)].
URD URA

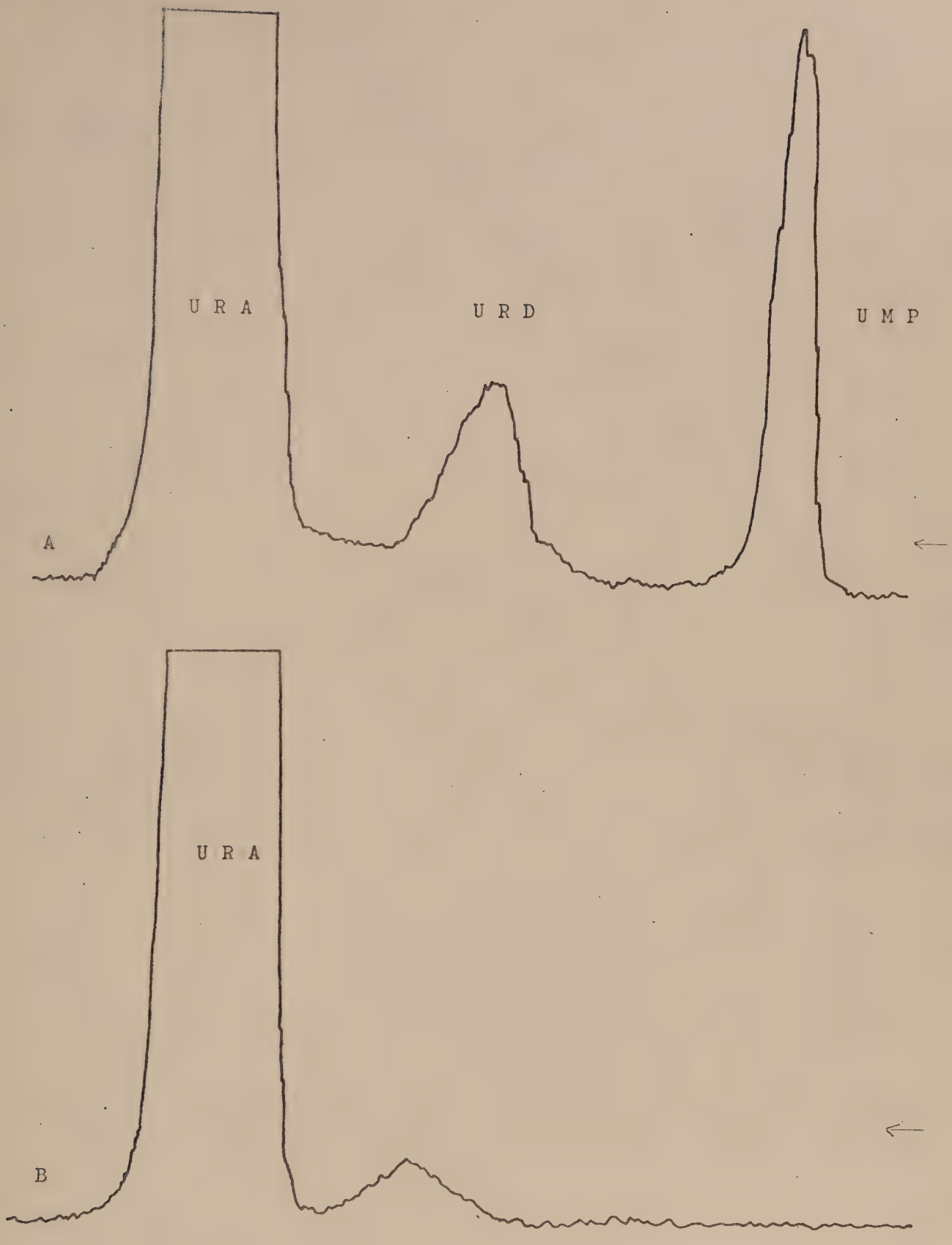
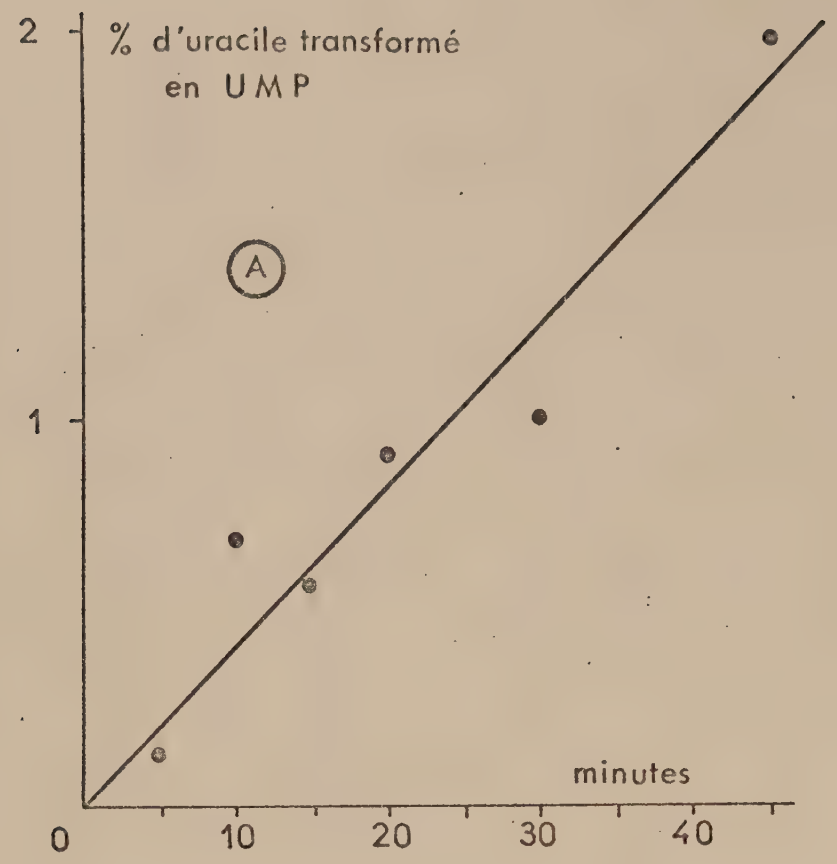


Figure 10 - Dosage de l'uridine-5'-phosphate pyrophosphorylase

radiochromatogrammes : A - mélange réactionnel
B - témoin sans PRPP

solvant de PLESNER



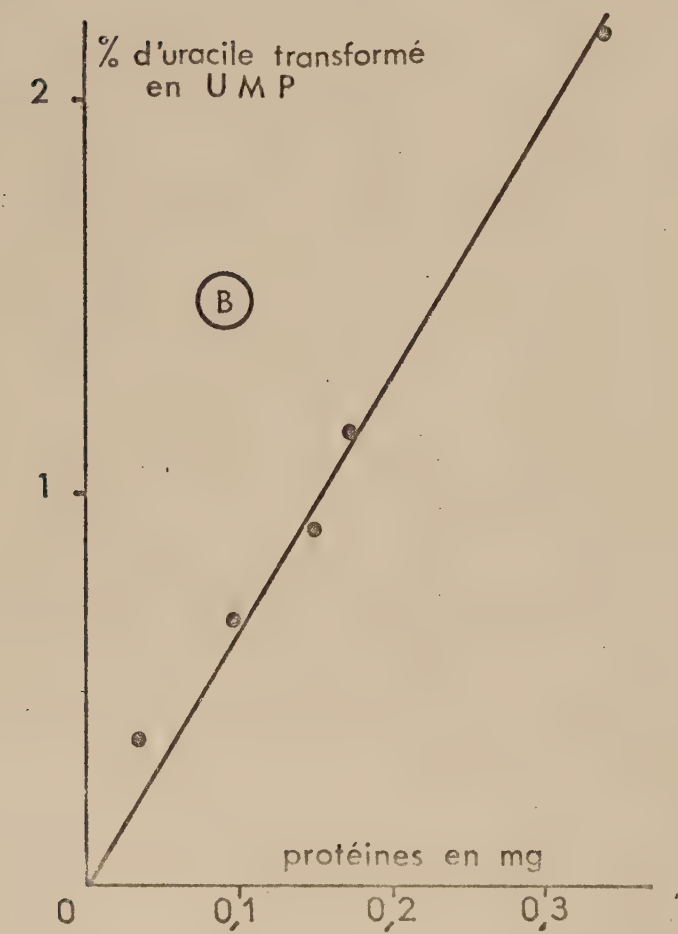


Figure 11 - Dosage de l'uridine-5'-phosphate pyrophosphorylase (UMPPase)

Pourcentage d'uracile transformé en UMP :
A - en fonction du temps d'incubation (130µg de protéines)
B - en fonction de la quantité de protéines (25mn d'incubation)
L'extrait enzymatique provient d'une souche + iso 10 (1) ; (mycélium congelé).

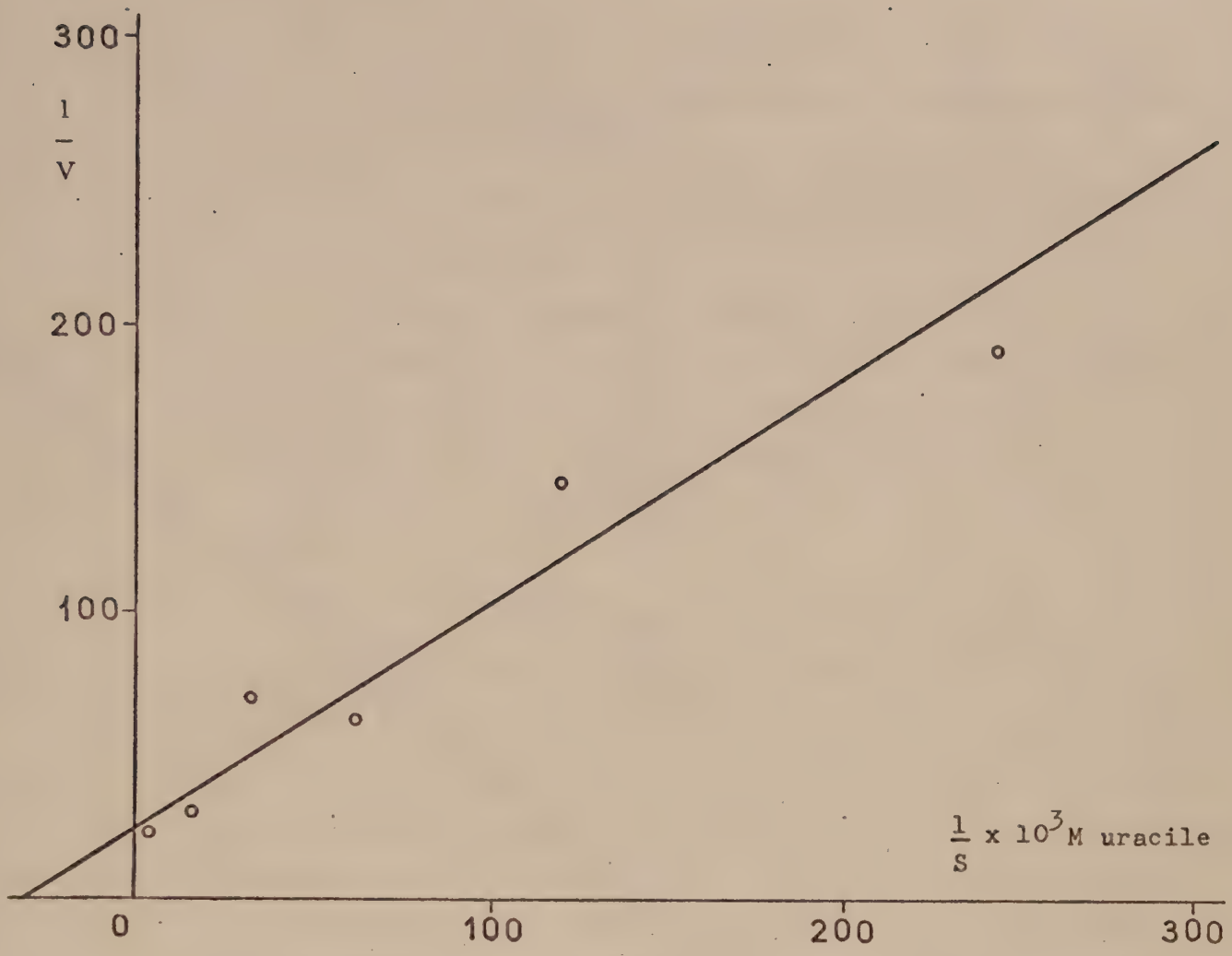


Figure 12 - Activité de l'UMPPase en fonction de la concentration en uracile.

coordonnées inverses, unités arbitraires pour la vitesse
Km apparent pour l'uracile 3.10^{-5}M .
L'extrait enzymatique provient de la souche + iso 10 (1).

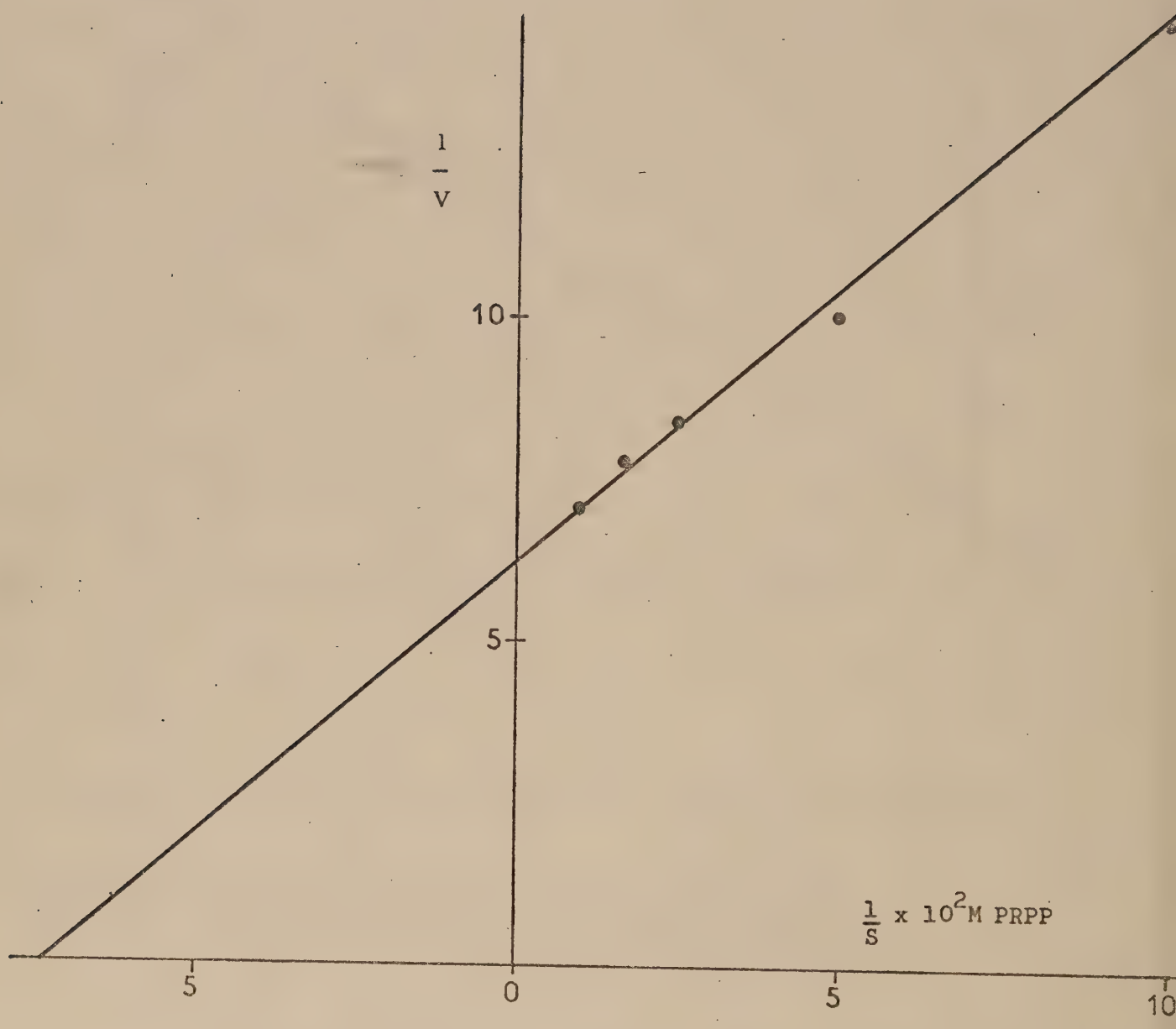


Figure 13 - Activité de l'UMPPase en fonction de la concentration en P

coordonnées inverses, unités arbitraires pour la vitesse
Km apparent pour le PRPP : $1,3.10^{-3}$M
L'extrait enzymatique provient de la souche + iso 10 (1) cultivée en milieu minimum liquide.(conditions standard)

est en faveur d'une linéarité acceptable de la réaction en fonction de la dose de protéines (fig. 9B).

6) - Dosage de l'uridine - 5'-phosphate pyrophosphorylase (UMPPase) (2.4.2.9).

La réaction catalysée est:

$$\text{uracile} + \text{PRPP} \longrightarrow \text{UMP} + \text{PP}$$

Nous avons utilisé la méthode de CRAWFORD, KORNBERG et SIMMS, (1957) modifiée ainsi: par tube réactionnel (vol. 0,5ml)

Tampon Tris pH8 : 46 µmoles
^{14}C-2 uracile : 0,46 µmoles
PRPP : 3 µmoles
Cl_2Mg : 7,35 µmoles

La réaction commence avec l'adjonction de l'extrait(50 à 200 ug de protéines). Deux témoins sont réalisés: un sans PRPP, l'autre sans extrait. Après 30 minutes d'incubation à 28°C on arrête la réaction en ajoutant dans chaque tube 0,01ml d'acide perchlorique pur. La suite du protocole est identique à celle du dosage de l'OMPPase. La chromatographie ascendante dans le solvant de PLESNER remplace la chromatographie descendante en butanol-acide acétique-eau(fig.10) (THOMSON 1960) . La quantité d'uracile transformé en UMP est proportionnelle au temps d'incubation et à la dose de protéines (fig. 11 A et B). Le Km apparent pour l'uracile est estimé à 3.10^{-5}M, pour le PRPP $1,3.10^{-3}$M. (fig. 12 et 13).

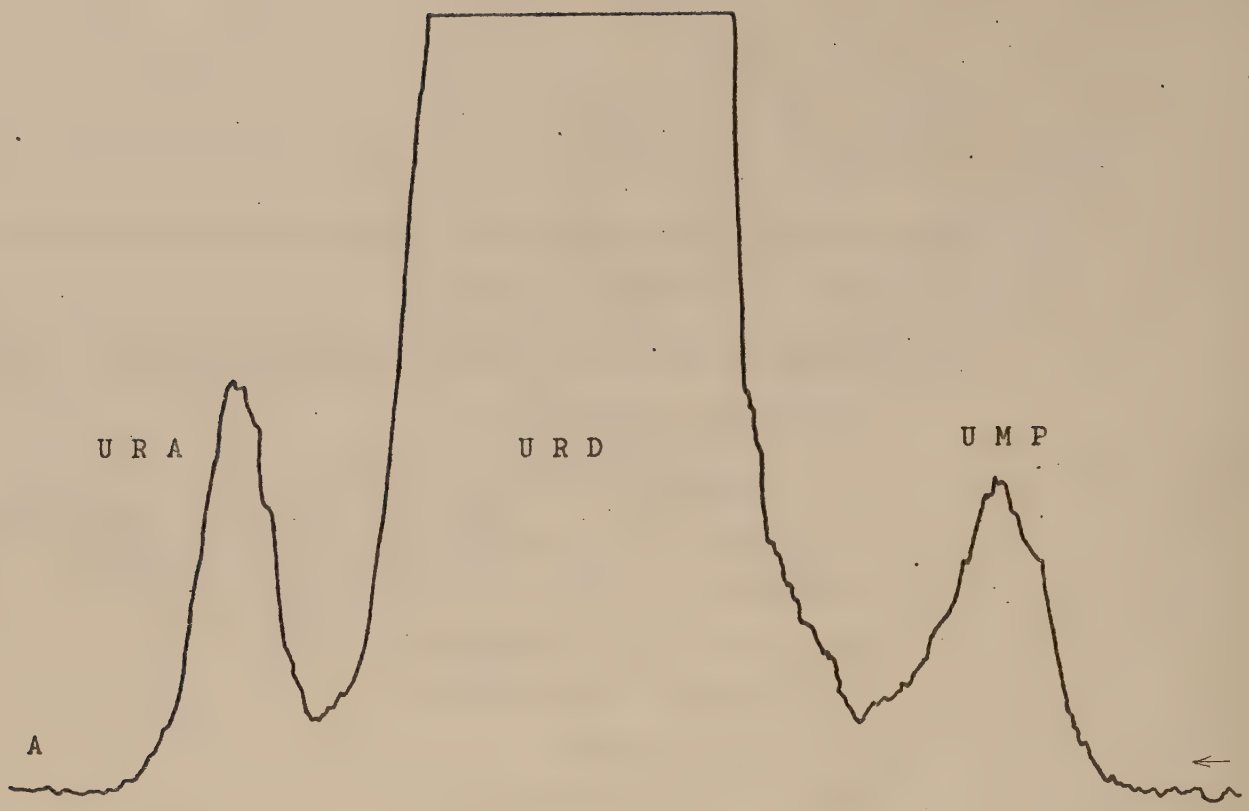
7) - Dosage de l'uridine kinase (2.7.1.48).

Cet enzyme catalyse la réaction

$$\text{uridine} + \text{ATP} \longrightarrow \text{UMP} + \text{ADP}$$

Nous utilisons la méthode de REICHARD et SKÖLD (1958) modifiée ainsi: par tube réactionnel (vol. 0,3ml)

Tampon Tris pH 7,5 : 30 µmoles
utidine ^{14}C-2 : 2 µmoles (0,2 µCi par umole)
ATP : 40 µmoles
Cl_2Mg : 10µmoles



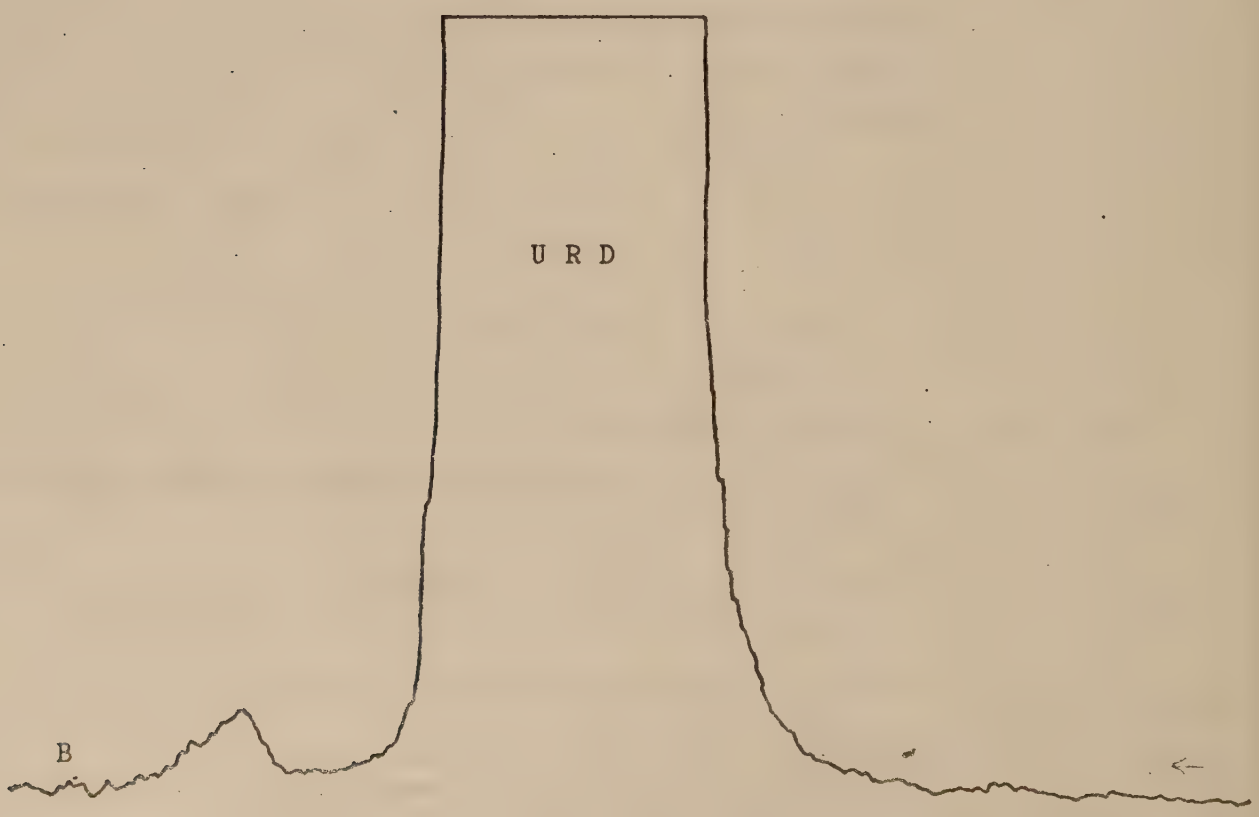
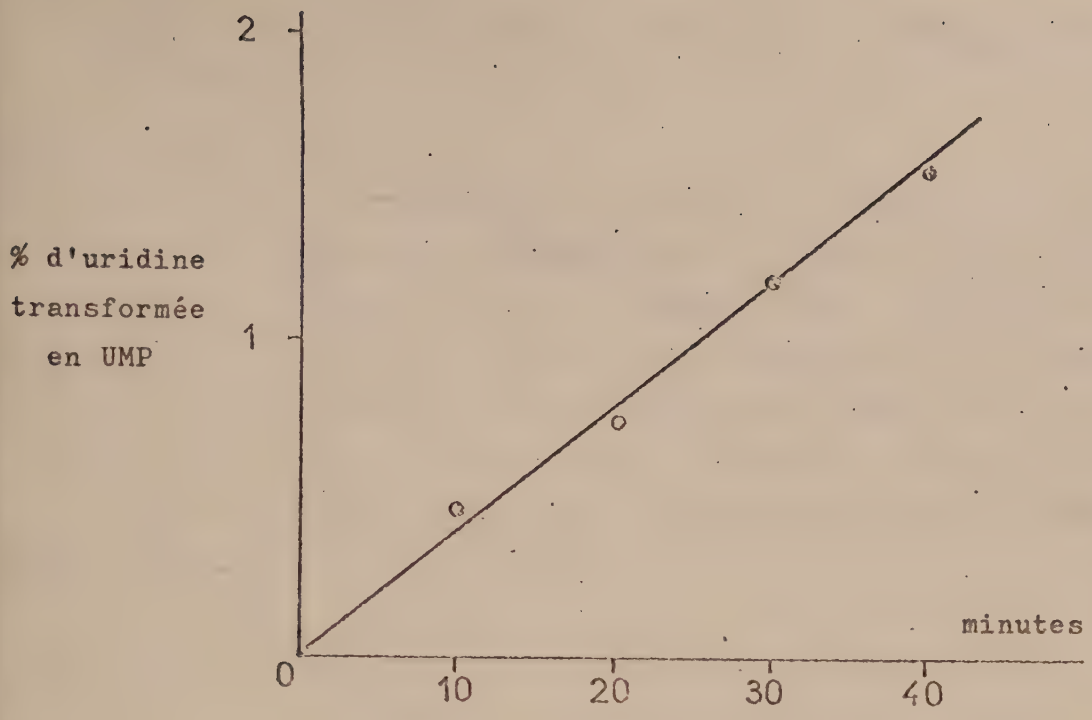


Figure 14 - Dosage de l'uridine kinase

radiochromatogrammes : A - mélange réactionnel
solvant de PLESNER B - témoin sans ATP



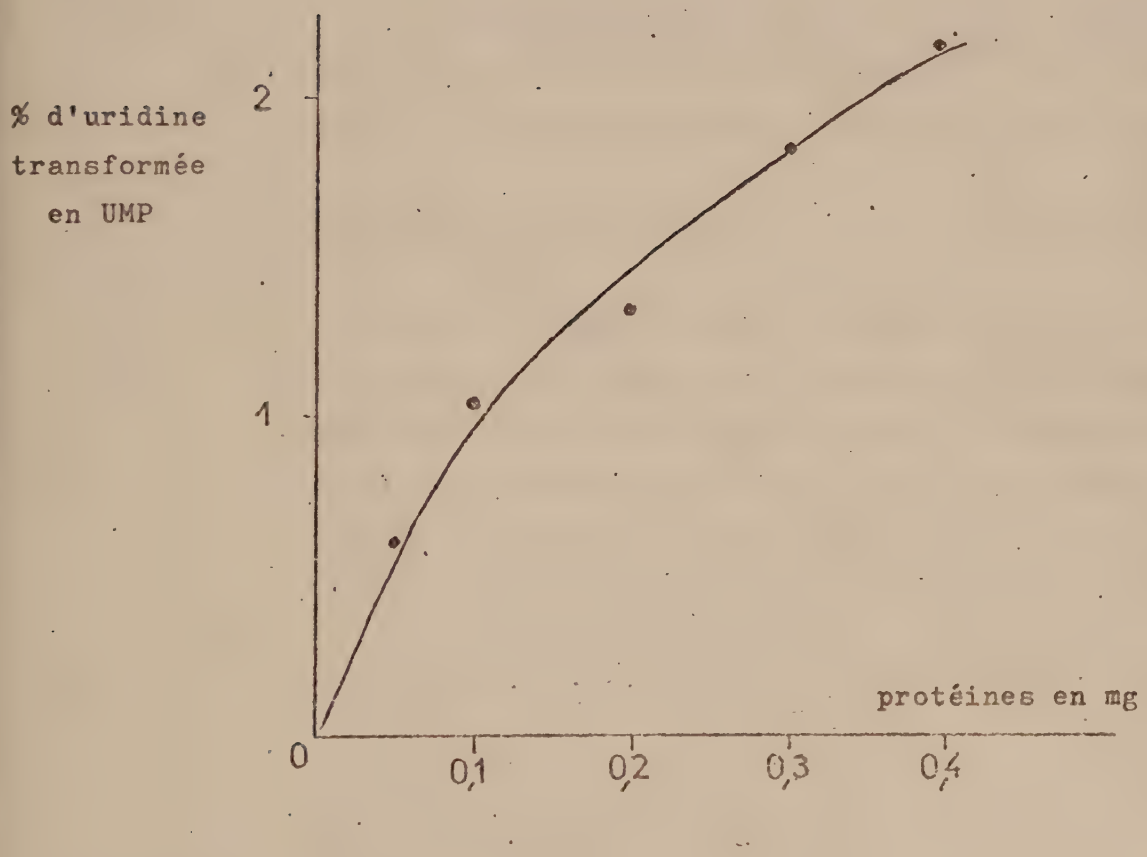


Figure 15 - Dosage de l'uridine kinase : formation d'UMP en fonction

A - du temps d'incubation (protéines 0,2mg)
B - de la quantité de protéines (30mn d'incubation)

L'extrait enzymatique provient de la souche + iso 10 cultivée dans les conditions standard en milieu minimum liquide (mycélium congelé)

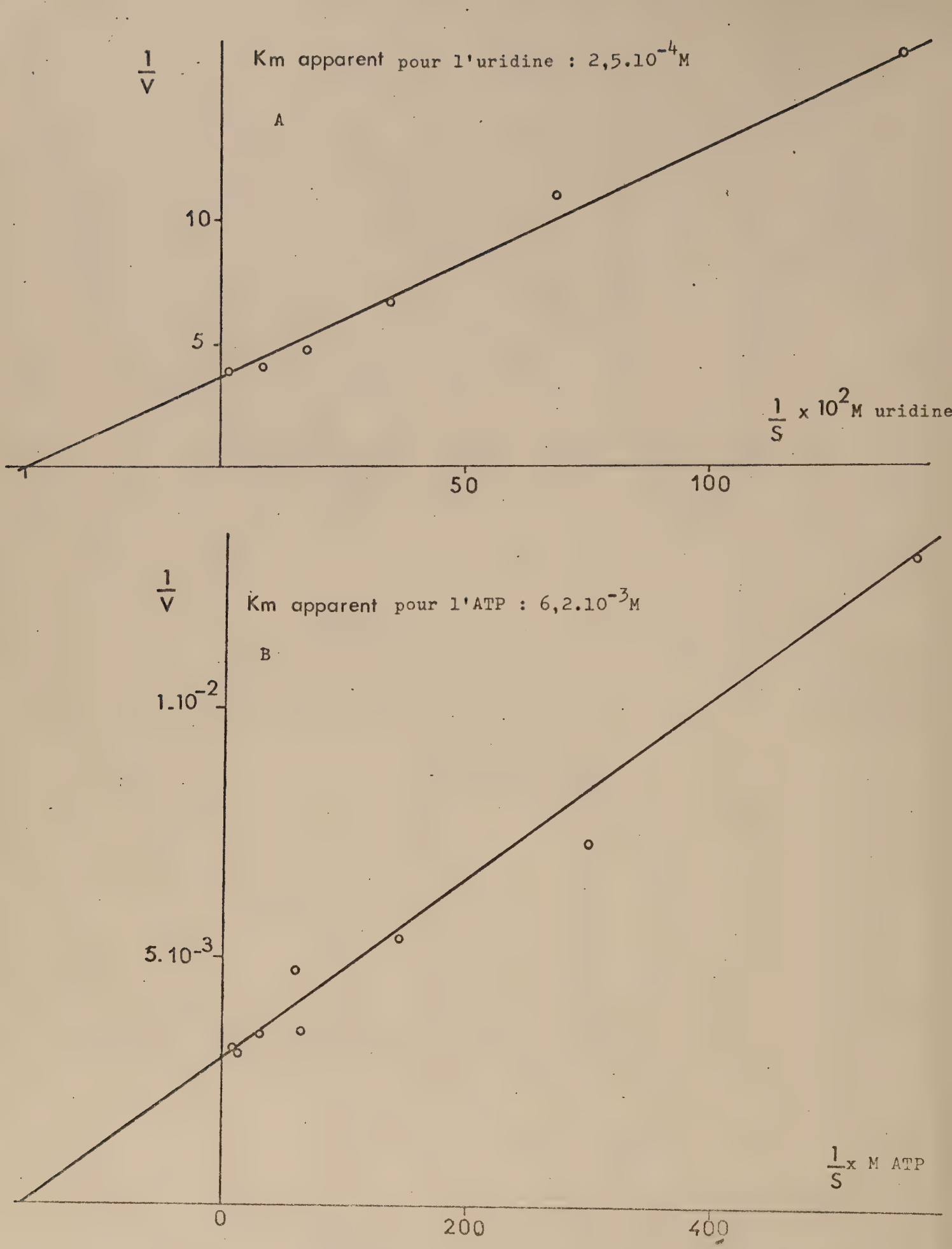


Figure 16 - Activité de l'uridine kinase en fonction de

A - la concentration en uridine
B - la concentration en ATP
coordonnées inverses ; unités arbitraires pour la vitesse

Un tube témoin comporte 0,3ml de mélange réactionnel additionné d'extrait enzymatique bouilli pendant 2 minutes. Dans les tubes réactionnels, la réaction commence avec l'adjonction de l'extrait. Les conditions d'incubations et de mesures de la quantité d'UMP formée sont les mêmes que pour l'UMPPase (fig. 14). La quantité d'UMP formée est proportionnelle au temps d'incubation (fig. 15). Les quantités de protéines utilisées sont identiques dans les dosages afin d'obtenir des résultats comparables.

Les Km apparents sont : pour l'uridine $2,5.10^{-4}$M et pour l'ATP $6,2.10^{-3}$M (fig. 16 A et B).

8) - Dosage de l'uridine ribohydrolase (3.2.2.3).

La réaction catalysée est:

uridine + H_2O ⟶ uracile + ribose

Le mélange réactionnel utilisé diffère de celui de l'uridine kinase par l'absence d'ATP. Les conditions d'incubation et de mesure de la quantité de produit formé sont les mêmes que pour l'uridine kinase (fig.17).

D - DOSAGE DES PROTEINES

Dans les extraits "bruts" et "sephadexés" les protéines totales sont dosées par la technique de FOLIN modifiée par LOWRY (1951). La teneur en protéines des thalles au cours de quelques expériences d'évaluation globale du métabolisme des pyrimidines est mesurée par la technique du Biuret (PARVIN et coll., 1965). Pour les deux techniques la sérum-albumine bovine a servi de référence.

E - TRAITEMENT DES EXTRAITS PAR L'ACIDE TRICHLORACETIQUE.

Le mycélium congelé est broyé à l'Ultra-Turrax. L'homogénat obtenu est centrifugé 20 minutes à 13.000 x g à 4°C, et le surnageant récupéré. Le culot est resuspendu dans du tampon phosphate M/8 puis recentrifugé à 13.000 x g 10 minutes à 4°C. Cette opération est répétée

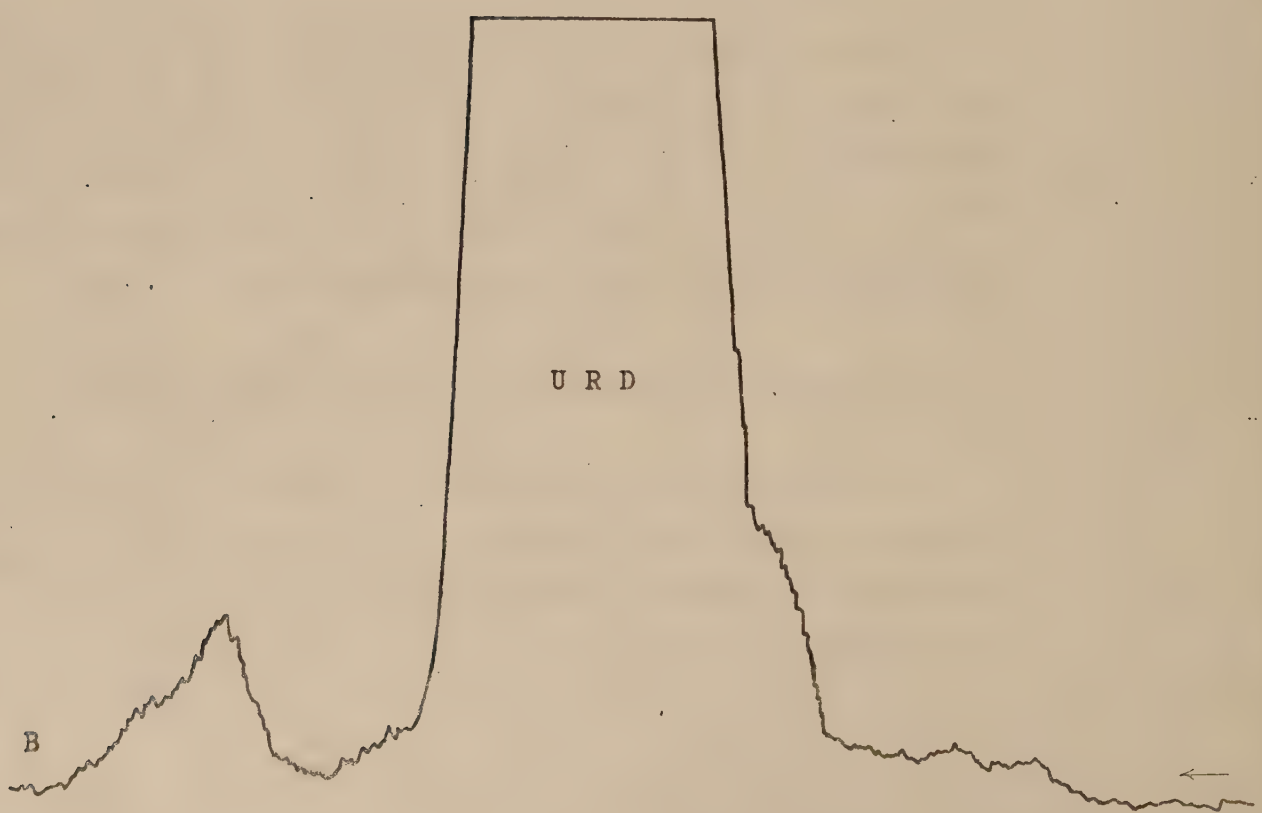


Figure 17 - Dosage de l'uridine ribohydrolase

radiochromatogrammes : A - mélange réactionnel
B - témoin temps O
solvant de PLESNER

deux fois, le culot est resuspendu chaque fois dans son propre volume de tampon phosphate.

Les trois surnageants sont rassemblés. Le volume de l'ensemble est mesuré après un prélèvement de 200 µl pour doser les protéines par la technique de Folin. Des expériences préliminaires à la mise au point de cette technique montrent qu'un 4ème rinçage du culot augmente la teneur en protéines de l'extrait brut de 5 à 10% seulement. On peut donc supposer avoir extrait au bout de 3 rinçages la majeure partie des molécules hydrosolubles contenues dans l'homogénat.

L'extrait brut est précipité par du TCA à 10%, volume à volume. Une centrifugation permet de séparer la fraction TCA-soluble (surnageant) de la fraction TCA-insoluble (culot). Le culot est remis en suspension par addition de 0,1ml d'eau bouillante et de 0,1ml de soude à 20%

F - "INCORPORATION"* DE PYRIMIDINES RADIO-ACTIVES.

Le mycélium est mis au contact de pyrimidines radio-actives contenues dans du milieu Mm solide, (gélosé) ou bien dans du milieu Mm liquide.

a) Milieu radioactif solide (en boîtes de Pétri).

Les thalles sont cultivés sur une rondelle de cellophane placée à la surface du milieu. Le temps de contact avec le milieu radioactif varie de 5 minutes à 120 heures. Les thalles (20 mm de diamètre) sont ensuite prélevés à la spatule et lavés dans du tampon phosphate 0,01M à 4°C. Leur radioactivité est alors mesurée ainsi que leur teneur en protéines ou leur poids de matière sèche.

b) Milieu radioactif liquide (en flacons).

La durée des cultures est 43 heures. Les conditions de cultures et de récolte sont celles pratiquées pour obtenir des extraits enzymatiques. L'extrait est préparé selon la technique de fractionnement par le TCA. Les pyrimidines radioactives sont ajoutées au milieu, de 30 secondes à 4 heures avant la récolte, selon les expériences.

* Le terme incorporation est utilisé au sens large car il ne concerne pas seulement les pyrimidines incorporées dans les macromolécules mais aussi celles qui se trouvent dans la fraction TCA soluble. Nous utilisons dans le même sens le terme fixation.

c) Mesure de la radioactivité "incorporée" dans les cellules.

Pour l'évaluation globale de la radioactivité, les thalles sont déposés dans des coupelles d'aluminium, séchés aux infra rouges. Le compteur de radioactivité est un appareil Tracerlab gas-flow à fenêtre mince.

Lorsque l'extrait est fractionné par le TCA, quelques microlitres de chacune des deux fractions sont déposé s à la micropipette (Microscaps Drummond) sur du papier Whatman 1. Les taches obtenues sont éluées par 0,7ml d'un mélange d'ammoniaque pur 0,2ml et de 0,5ml d'eau. La radioactivité des éluats est mesurée dans un compteur à scintillation du type Packard Tricarb. Le liquide scintillant est la solution de BRAY (1960).

Dans certains cas les fractions TCA solubles sont soumises à la chromatographie bidimensionnelle en présence d'un mélange traceur de pyrimidines non radioactives:

- sur papier Whatman 1 avec:

1) - solvant de PLESNER (THOMSON, 1960)

acétate d'ammonium 5M, pH9	: 20ml
Tétraborate de sodium saturé	: 80ml
Versène 0,5M	0,5ml
éthanol absolu	:180ml

2) - mélange de

isopropanol	:130ml
H_2O	: 37ml
HCl concentré	: 33ml

- sur chromatoplaque de cellulose dans :

1) - H_2O

2) - n-butanol : 60 ml
méthanol : 20 ml
H_2O : 20 ml
NH_4OH : 1ml

Après migration les taches obtenues sont traitées comme indiqué au paragraphe précédent. S'il s'agit de chromatoplaques, la poudre de cellulose correspondant à une tache est éluée directement dans la fiole à scintillation.

G - MISE EN EVIDENCE DE L'EXCRETION DE PYRIMIDINES.

Les souches à étudier sont mises en culture sur du milieu Mm solide recouvert d'une rondelle de cellophane. Quand le diamètre des thalles atteint 20mm, les souches sont transplantées sur un milieu Mm dépourvu de dextrose et de thiamine. L'utilisation de ce milieu (10ml par boîte) permet d'obtenir, par élution, des spectres de pyrimidines peu modifiés par rapport à ceux de solutions aqueuses de pyrimidines. Après un séjour de 24 à 48 heures sur ce milieu les thalles sont éliminés et le milieu d'excrétion est analysé selon trois critères.

a) Le critère biologique.

Le milieu d'excrétion est recouvert par 10 ml de milieu Mm gélosé; des souches ur^-y sont ensemencées. Elles ne peuvent croître que si des pyrimidines ont été excrétées par les souches étudiées. Le "milieu d'excrétion" d'une culture de souche sauvage est utilisé comme témoin. Simultanément des souches ur^- sont ensemencées sur du milieu Mm contenant des pyrimidines (uracile, uridine, cytidine) à différentes concentrations. Ces cultures servent de référence.

b et c) - Les critères spectrophotométrique et chromatographique.

Le milieu d'excrétion est recouvert de 15ml d'eau à 30°C. Nous avons montré en ajoutant dans ce milieu des pyrimidines ^{14}C, en quantité connue qu'au bout de deux heures le liquide d'élution comporte 80 à 90% des pyrimidines du milieu. Cet éluat est lyophylisé pour réduire son volume et centrifugé pour éliminer l'excès de gélose. La perte de pyrimidine ne dépasse pas 10% au cours de ce traitement. Le spectre d'absorption de l'éluat, de 320 à 200 nanomètres, est établi au moyen d'un spectrophotomètre enregistreur Beckman. La cuve de référence contient un

éluat obtenu à partir d'une culture de souche sauvage + iso 10 (1). Le spectre est comparé à celui de différentes pyrimidines à plusieurs pH.

Cet éluat est chromatographié en même temps qu'un mélange témoin de pyrimidines. Les pyrimidines excrétées sont repérées en lumière UV et identifiées par migration.

C H A P I T R E II

LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE L'UMP ET SA REGULATION

A - BIOSYNTHESE DE L'UMP CHEZ DIFFERENTS ORGANISMES

Les travaux effectués chez de nombreux organismes ont permis d'établir une chaîne de biosynthèse commune à tous les êtres vivants, des Bactéries aux Mammifères (Fig. 1). Les principales différences entre ces organismes concernent l'origine du carbamylphosphate et son utilisation :

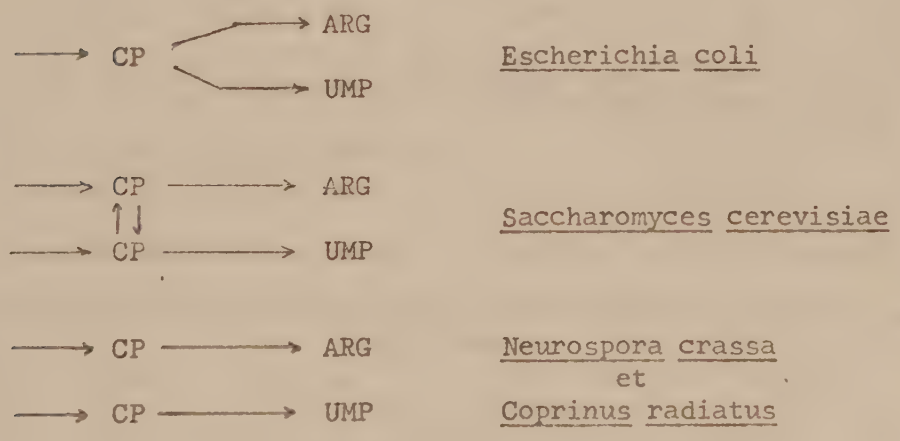
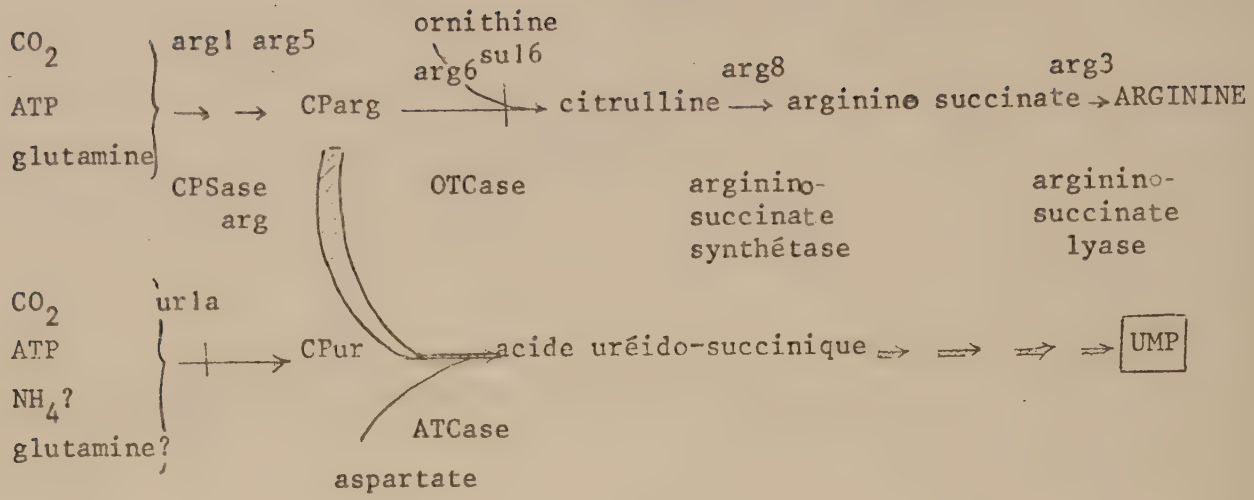
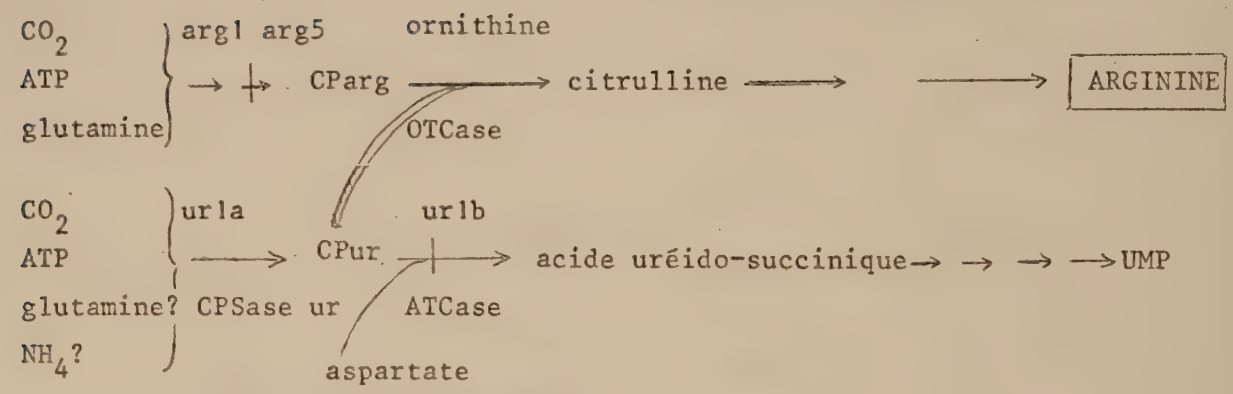


Figure 18 : Origine et utilisation du carbamylphosphate chez différents organismes.

A



B



Figures 19 A et 19 B : Deux cas de décompartimentation du carbamylphosphate (CP).

A - Chez une souche arg6. su16, ur 1a : le CParg est dévié vers la chaîne de l'UMP.

B - Chez une souche arg5, ur 1b : le CPur est dévié vers la chaîne de l'arginine.

Chez le Colibacille, le carbamylphosphate est synthétisé par un seul enzyme et utilisé par deux voies de biosynthèse, celle de l'arginine et celle de l'UMP (PIERARD et WIAME, 1964). Chez la Levure, deux enzymes synthétisent le carbamylphosphate (LACROUTE et Coll., 1965), mais les souches mutées dépourvues de l'une ou de l'autre activité sont capables de croître sur milieu minimum grâce à l'utilisation croisée du carbamylphosphate d'une chaîne par l'autre voie de biosynthèse. Chez le Coprin (CABET et Coll., 1965), comme chez Neurospora (REISSIG, 1960), les mutants bloqués dans la synthèse du carbamylphosphate de la chaîne de l'arginine (CParg) sont auxotrophes pour l'arginine et les mutants bloqués dans la synthèse du carbamylphosphate de la chaîne de l'UMP (CPur) sont auxotrophes pour les pyrimidines. Normalement il n'y a donc pas d'échange de CP entre les deux chaînes (Fig. 18).

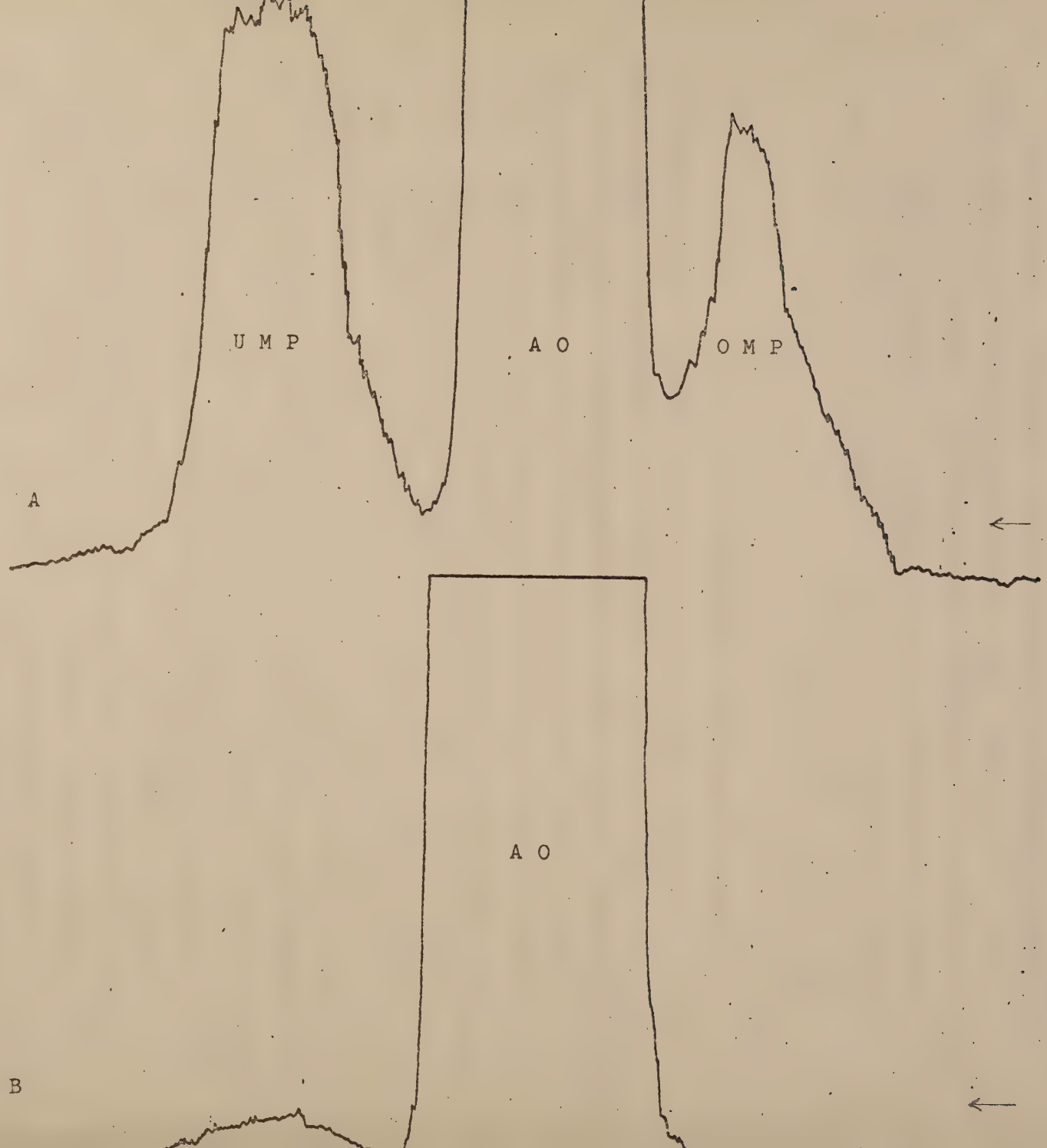
B - DECOMPARTIMENTATION DU CARBAMYLPHOSPHATE

Toutefois, chez C. radiatus, la décompartimentation du carbamylphosphate a lieu dans deux cas (Fig. 19) : chez les souches où l'utilisation du CParg est empêchée ou ralentie par une modification du fonctionnement de l'OTCase (CABET, 1966 ; CABET et Coll., 1967, CABET-BUSSON, thèse en préparation), le CParg est utilisé pour la synthèse de l'UMP (Fig. 19A) ; chez les souches où une modification de l'ATCase arrête ou réduit l'utilisation du CPur, l'OTCase peut employer le CPur comme substrat pour former de la citrulline ultérieurement transformée en arginine (Fig. 19B).

Le problème de la décompartimentation du CP chez le Coprin est exposé ici succintement car il constitue le sujet de deux mémoires : (CALLEN, 1972, thèse ; CABET-BUSSON, thèse en préparation).

La chaîne de biosynthèse de l'UMP, linéaire, formée d'un nombre d'étapes peu élevé, présentant des possibilités d'interaction avec la voie de l'arginine nous a paru favorable à une étude de régulation chez Coprinus radiatus, organisme qui permet une analyse génétique très précise.

Il était indispensable de rechercher le plus grand nombre possible de mutants auxotrophes pour les pyrimidines avant d'entreprendre ce travail.


UMP
AO
OMP
A
AO
B

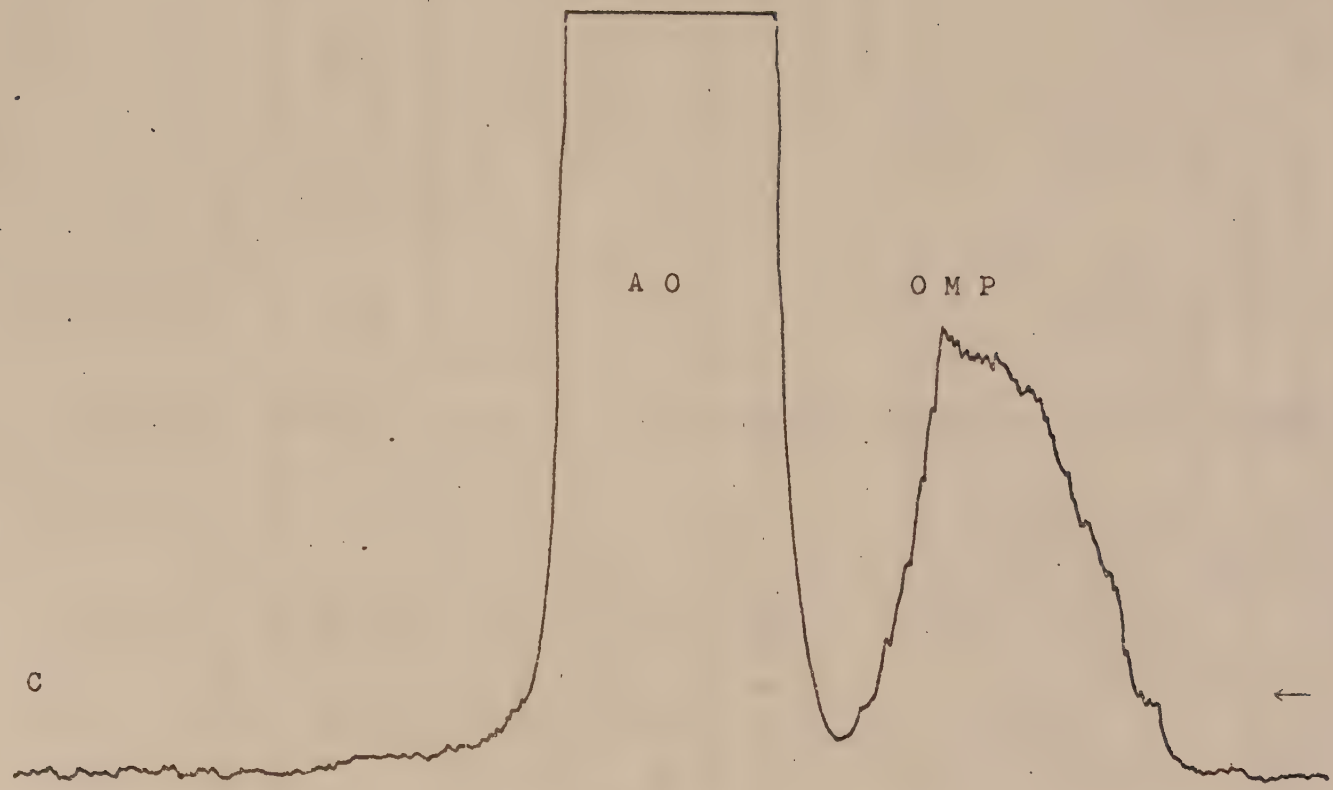


Figure 20 - Démonstration de l'absence d'activité OMP décarboxylase d'un extrait de souche ur13

radiochromatogrammes : A - mélange réactionnel avec un extrait de + iso 10
B - témoin sans PRPP
C - mélange réactionnel avec un extrait de souche ur 13.22
le mélange réactionnel est celui de l'OMPPase ; solvant : gradient de formiate d'ammonium 0,2M à 4M pH6,2.

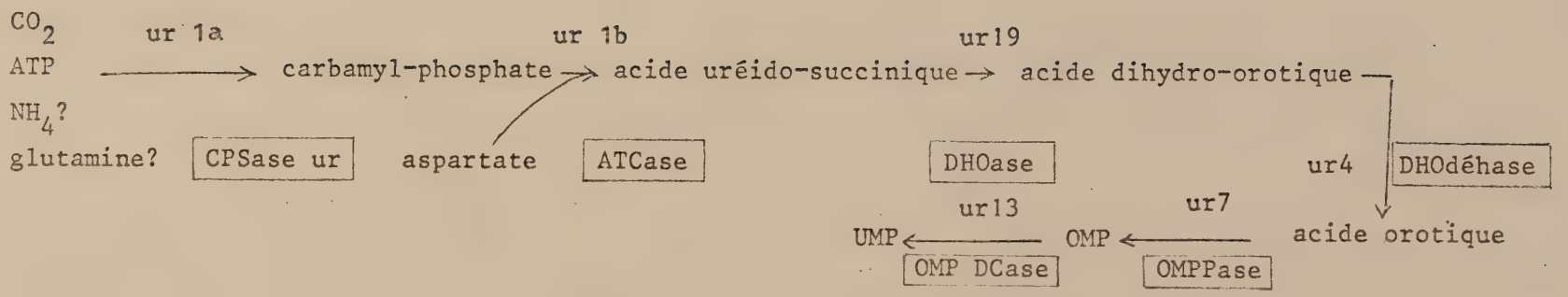


Figure 21 - Schéma de la chaîne de biosynthèse de l'UMP chez Coprinus radiatus. (Voie de l'acide orotique).

C - RESULTATS OBTENUS CHEZ LE COPRIN

1. Les souches auxotrophes pour les pyrimidines

PREVOST (1962) a obtenu par mutagénèse de nombreuses souches auxotrophes pour les pyrimidines. Certaines de ces souches présentent une croissance très lente ou bien un taux de germination extrêmement faible dû à des anomalies chromosomiques (mutants obtenus par action des rayons X). Ces défauts rendant malcommode une étude enzymologique et génétique, nous avons entrepris la recherche de mutants ur^-. Nous avons pu obtenir par action de l'acide nitreux ou de la nitrosoguanidine sur des spores sauvages issues du croisement + iso 10 (1) x + iso 10 (4) de nouveaux mutants (Tableau 1). Ils sont tous allèles des mutants obtenus précédemment et classés par PREVOST en cinq loci (1962).

2. Activités enzymatiques contrôlées par les différents loci ur^-.

Les loci contrôlant cinq activités enzymatiques de la voie de biosynthèse ont été déterminés par PREVOST (1966) ; ce sont ur 1a : CPSase ur, ur 1b : ATCase, ur 19 : DHOase, ur 4 : DHO déhase, ur 7 : OMPPase.

La mise au point d'un dosage utilisant l'acide orotique ^{14}C-2 comme substrat de l'OMPPase nous a permis de situer l'interruption de la chaîne de biosynthèse correspondant aux mutations obtenues au locus ur 13 : un extrait enzymatique de souche sauvage + iso 10 (1) permet la transformation *in vitro* de l'acide orotique en OMP et en UMP ; en utilisant un extrait de souche mutante ur 13 on obtient de l'OMP, mais pas d'UMP (Fig.20). Le locus ur 13 contrôle donc l'activité OMP DCase. Un schéma des relations gène-enzyme pour la chaîne de biosynthèse de l'UMP par la voie de l'acide orotique est représenté Fig. 21.

3. Localisation génétique des mutations ur^-

PREVOST (1962 et 1966) a localisé les mutations ur^- : ur 1 sur le chromosome VI, ur 19 sur le chromosome VIII, ur 4 sur le chromosome IV, ur 7 sur le chromosome VII et ur 13 sur le chromosome III.

La souche ur 13 d'origine, obtenue par mutagénèse aux rayons X est caractérisée par un taux de germination d'environ 50 % alors que pour les spores sauvages ce taux est de 95 à 100 % (PREVOST, 1962). Une telle diminution du pourcentage de germination est souvent la conséquence d'une anomalie chromosomique.

TABLEAU 4

Croisement	Tétrades ou spores	% de spores recombinées	2δ	% de germination
ur 13.22 x ur 19	19-0:3 / 22	7	(3)	92
ur 13.22 x ad 21.33	41R / 156 spores	26	(3)	89
ur 13.22 x FUR 0	10-0:13 / 23	28	(5)	70
ur 19 x FUR 0	23-0:19 / 42	23	(3)	38
ur 19 x ad 21.33	7-0:6 / 13	23	(6)	84
ad 21.33 x FUR 0	1R / 45 spores	2	(2)	51
ur 13 x FUR 10	30R / 120 spores	25	(4)	90

Etablissement de la carte du chromosome VIII.

R : signifie spore recombinée. Pour les tétrades les fractions représentent $\frac{\text{nombre de tétrades (ditypes parentales-ditypes recombinées : tétratype}}{\text{nombre de tétrades étudiées.}}$

Nous avons donc recherché d'autres mutants ur 13. Par action de l'acide nitreux, nous avons obtenu des allèles de la mutation ur 13 d'origine et nous les avons localisés sur le chromosome VIII (Fig. 22) : la souche originelle ur 13 comportait une translocation d'un segment du chromosome VIII sur le chromosome III au voisinage du locus de compatibilité sexuelle A.

L'étude génétique du locus ur 13 nous a permis de préciser la carte du chromosome VIII (Tableau 4). Ce chromosome est le dernier en date des groupes de liaisons mis en évidence chez le Coprin.

Un test 3 points a permis de lever l'ambiguïté sur les positions respectives des gènes ad21 et FURO vis-à-vis du locus ur13.

Le test 3 points a été réalisé en croisant entre elles les souches haploïdes ur 13.22,ad 21.33 (2) et FUR 0.1 (3) : croisement (ur 13.22,ad 21.33,+) x (+,+,FUR 0.1).

Tableau 5

Phénotype et génotype des descendants issus du croisement ur 13.22,ad 21.33 (2) x FUR 0 (3)

Génotype			Phénotype	Nombre obtenu
ur 13.22	ad 21.33	+	ur^- ad^- fu^s	39
+	+	FUR 0.1	+ + fu^r	40
ur 13.22	+	+	ur^- + +	0
+	ad 21.33	FUR 0.1	+ ad^- fu^r	0
ur 13.22	+	FUR 0.1	(létal)	0
+	ad 21.33	+	+ ad^- fu^s	14
ur 13	ad 21.33	FUR 0.1	(létal)	0
+	+	+	+ + fu^s	1

fu^r signifie résistant à l'inhibition de croissance due aux 5-fluoropyrimidines.

fu^s signifie sensible aux 5-fluoropyrimidines.

L'analyse génétique a porté sur des tétrades.

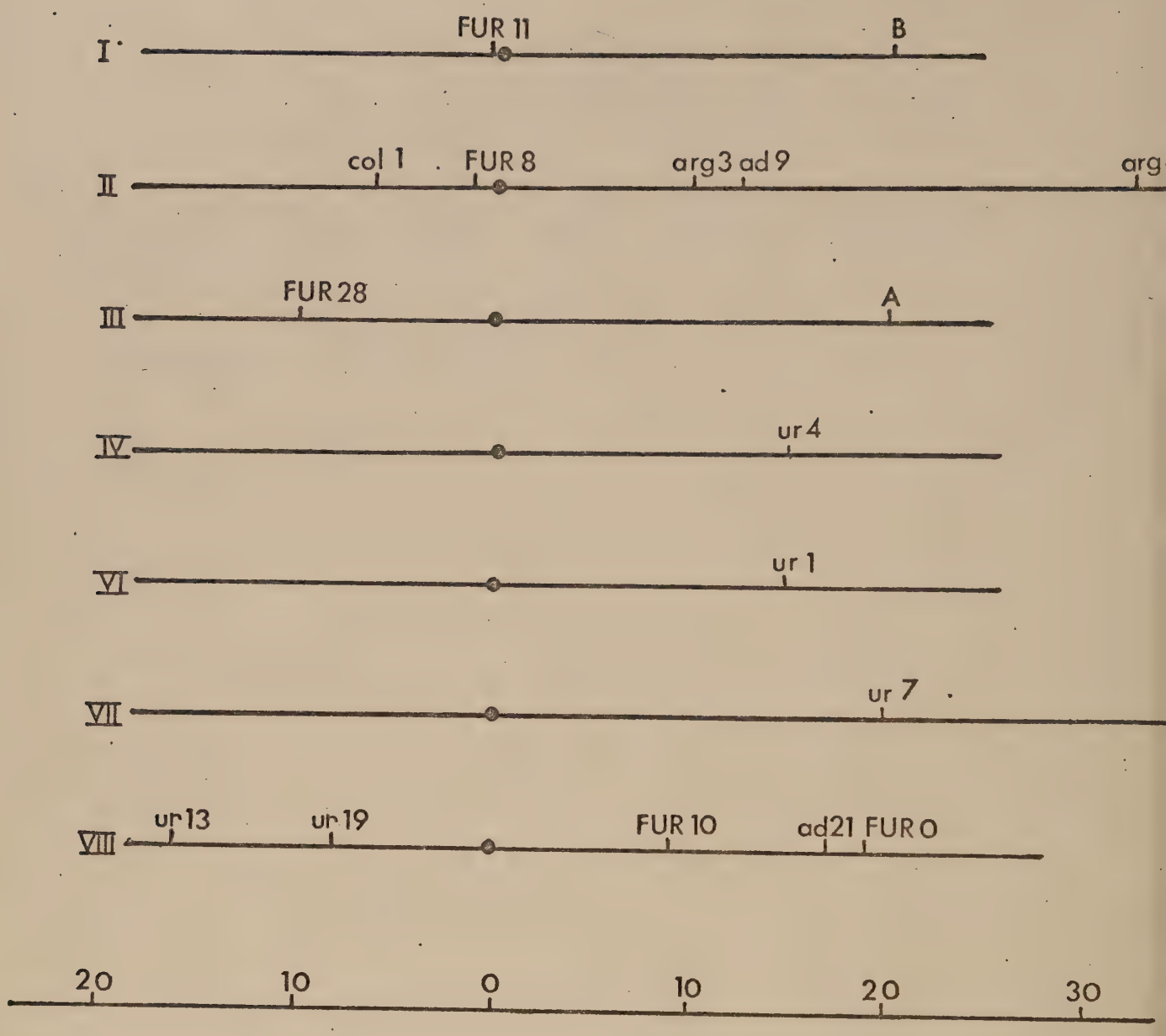


Figure 22 - Carte chromosomique de Coprinus radiatus

L'échelle est en centimorgans (unités de crossing-over). Nous avons fait figurer les loci mentionnés dans ce mémoire.

Pour les trois gènes en cause, deux possibilités existent quant à l'ordre des marqueurs a) ur 13 —— ad 21 - FUR 0

b) ur 13 —— FUR 0 - ad 21

- dans l'hypothèse a), chez la cellule diploïde dont les spores sont issues par méiose,on a la situation suivante :

ur 13	ad 21	+
+	+	FUR 0

Dans ce cas,les souches recombinées(+ ad +)sont formées à la suite d'un seul crossing-over entre les loci ur 13 et ad 21 et la souche recombinée sauvage à la suite d'un seul crossing-over entre les loci ad 21 et FUR 0. La formation de souches recombinées (ur 13 + +) et(+ ad 21 FUR 0) non observées, nécessite l'intervention de deux crossing-over.

- Dans l'hypothèse b), après la caryogamie la situation serait :

ur 13	+	ad 21
+	FUR 0	+

Les souches recombinées (+ + ad 21) auraient pour origine un seul crossing-over entre les loci ur 13 et FUR 0 ; Les souches recombinées(ur 13 + +)et (+ FUR 0 ad 21), non observées, se formeraient à la suite d'un seul crossing-over entre les loci FUR 0 et ad 21. L'apparition de souches sauvages (+ + +) nécessiterait deux crossing-over.

En fait on ne trouve pas de souches recombinées (ur 13 + +) ni (+ ad 21 FUR 0) dont la probabilité est $\frac{0,02}{2}$ = 0,01, 1 % pour chacune dans les deux hypothèses alors qu'on observe un recombinant (+ + +) dont la probabilité est $\frac{0,26 \times 0,02}{2}$ = 0,25 % dans l'hypothèse b) et 1 % dans l'hypothèse a). La fréquence de ce recombinant, $\frac{1}{94}$ = 0,0106 étant proche du 1 % théorique, l'hypothèse a) peut être retenue mais des expériences complémentaires sont nécessaires pour préciser l'ordre des gènes.

4. Accumulation de métabolites intermédiaires

Les produits intermédiaires des voies de biosynthèse sont souvent présents en faibles quantités chez les souches sauvages. Chez les souches mutées on observe couramment une accumulation du produit situé juste avant l'interruption de la chaîne.

Chez le Coprin l'accumulation de carbamylphosphate ur chez les souches ur 1b a été mise en évidence de façon indirecte par GANS et MASSON, (1969). Les doubles mutants CPSase arg$^-$ ATCase$^-$ sont capables de croître sur milieu Mm supplémenté en pyrimidine (uracile par exemple) en l'absence d'arginine. Ces faits sont interprétés en supposant que le CP ur qui ne peut alors être utilisé pour la synthèse de l'acide uréido-succinique est couplé avec l'ornithine par l'OTCase. Finalement de l'arginine d'origine biosynthétique est formée de cette manière (Fig.19B). On suppose que le CP est d'abord accumulé en amont de l'interruption de la chaîne de l'UMP comme l'ont observé WILLIAMS, BERNHARDT et DAVIS (1971) chez une souche ATCase$^-$ de Neurospora, puis utilisé dans la chaîne de l'arginine.

L'accumulation d'acide uréido-succinique a fait l'objet d'études quantitatives, MOTTA (résultats non publiés), CALLEN (1968). Chez la souche sauvage on ne trouve pas d'A.U.S. en quantité décelable (inférieure à 2 nmoles par mg de protéines), mais la souche ur 19 (DHOase$^-$) en contient 0,87 µmoles par mg de protéines au bout de six jours de culture sur milieu complet. L'effet toxique de l'A.U.S. accumulé est net chez la souche arg6. su16,ur 19 puisque cette souche est incapable de croître sur milieu Mm supplémenté en pyrimidine (MOTTA, 1967).

En ce qui concerne les autres métabolites, la comparaison de chromatogrammes d'extraits bruts de souche sauvage d'une souche ur 7.40 et d'une souche ur 13.22 révèle la présence de taches bien visibles en U.V. chez les souches mutées alors qu'elles sont imperceptibles chez la souche sauvage. Il s'agit d'acide orotique chez ur 7, d'acide orotique et d'orotidine chez ur 13. L'orotidine provient vraisemblablement d'une dégradation de l'OMP formée par la souche ur 13.

Nous avons fait figurer dans le tableau 5bis les métabolites accumulés et les activités enzymatiques correspondant aux différents loci ur$^-$.

Locus	Activité enzymatique affectée	Métabolite accumulé
ur 1a	CPSase ur	
ur 1b	ATCase	CPur
ur 19	DHOase	AUS
ur 4	DHOdéhase	
ur 7	OMPPase	ac. orotique
ur 13	OMP DCase	ac. orotique et orotidine

Tableau 5bis - Accumulation de métabolites chez les souches ur$^-$.

5. Les activités enzymatiques de biosynthèse de l'UMP chez la souche sauvage.

De nombreux dosages ont été effectués sur des extraits de souche + iso 10 (1). Les résultats figurant dans le tableau 6 ont été obtenus dans les conditions de culture les plus couramment pratiquées : milieu minimum liquide pour une durée de 43 heures ; la majeure partie des dosages concerne des extraits provenant de mycélium congelé. HIRSCH (résultats non publiés) a mis en évidence la cryosensibilité de la CPase ur et de l'ATCase : les deux tiers de l'activité ATCase sont perdus par congélation à -80°C. Nous n'avons pas observé de différence dans l'activité de la DHOase selon que l'extrait provient de mycélium frais ou congelé. Par contre, l'OTCase de Coprin perd une partie de son activité au cours de l'extraction à partir de mycélium frais. L'OMPPase ne semble pas modifiée mais les résultats obtenus à partir d'extrait frais sont sujets à caution car l'apparition d'une grande quantité d'orotidine au cours de la réaction rend difficile l'évaluation radiochromatographique de la quantité de produit formé.

Les activités enzymatiques des souches iso 10 de signe (2) (3) (4) ont été mesurées. Les résultats ne sont pas significativement différents de ceux du Tableau 6 (souche iso 10 de signe (1)).

Souche + iso 10 (1)	Activités spécifiques	
	Extrait provenant de mycélium congelé	Extrait provenant de mycélium frais
CPSase ur	20*	100*
ATCase	1.500	5.000
DHOase	3.900	4.000
DHOdéhase	660°	
OMPPase	690	(580 ?)
OMP DCase	540°	
OTCase	5.000	2.900

Tableau 6 - Activités spécifiques chez + iso 10 (1) des enzymes de la chaîne de biosynthèse de l'UMP.

- A partir de mycélium frais : moyenne de 15 expériences ; congelé : 6 expériences ; les variations extrêmes sont de ± 30%.
- Les conditions de culture sont les conditions standard, les extraits sont filtrés sur colonne de Sephadex G25.
- Les activités spécifiques sont exprimées en nmoles de substrat transformé/mg protéines/heure. L'OTCase est prise comme référence.
° PREVOST (1966) ; * HIRSCH, résultats non publiés.

6.Conditions d'une étude physiologique de la régulation.

Pour analyser le mode de régulation de la voie de biosynthèse de l'UMP nous avons entrepris deux types d'expériences. L'un consiste à faire varier la concentration en pyrimidines du milieu de culture afin de modifier leur concentration intracellulaire et à mesurer les activités enzymatiques dans ces différentes conditions. Les effets observés pourront alors être imputés à des variations du taux de synthèse des enzymes; rappelons que les extraits ont été débarrassés des petites molécules par filtration sur colonne de Sephadex G25. Il convient d'utiliser pour supplémenter les milieux des produits capables de pénétrer dans le mycélium et d'y être métabolisés. Ces caractéristiques sont étudiées dans le chapitre III de ce mémoire. L'autre type d'expériences permet de déterminer les possibilités de régulation par rétroinhibition ; les activités enzymatiques sont mesurées in vitro en présence et en absence de composés pyrimidiques dérivés de la chaîne de biosynthèse afin de tester le pouvoir inhibiteur de ces produits.

Ces expériences ont porté sur différentes souches, prototrophes et auxotrophes ; nous envisagerons tout d'abord les résultats obtenus chez la souche sauvage.

7. Effet des pyrimidines présentes dans le milieu de culture de la souche sauvage.

Nous avons supplémenté le milieu de culture en métabolites utilisés par le Coprin comme sources de pyrimidines, uracile, uridine ou cytidine. La concentration de ces produits varie de 1.10^{-4} à 2.10^{-2} M. Il s'agit de cultures en flacons.

Dans le cas où la souche + iso 10 se développe pendant 43 heures (conditions standard décrites dans Matériel et Méthodes) dans le milieu liquide, minimum d'une part, supplémenté en pyrimidines à concentration élevée d'autre part, on n'observe pas de différences significatives entre les activités spécifiques des enzymes de biosynthèse de ces deux cultures.

Lors de cultures plus longues, précultures en flacons suivies d'un réensemencement en milieu neuf avec ou sans mixage (voir Chapitre I) nous avons observé des différences d'activité spécifique dans plusieurs expériences. L'activité spécifique de l'ATCase est diminuée par la présence d'uridine ou d'uracile 10^{-3} M dans le milieu de culture de manière faible mais significative, (observée à plusieurs reprises): elle atteint en moyenne 70 % de l'activité spécifique de l'ATCase d'une culture en milieu minimum. Il peut s'agir d'une légère diminution du taux de synthèse de l'ATCase par répression ; à concentration égale, l'uracile est un peu moins efficace que l'uridine. Les autres enzymes de la voie de biosynthèse ne sont pas touchés.

L'effet minime ou nul des pyrimidines externes sur les enzymes de biosynthèse de l'UMP peut donner lieu à plusieurs interprétations. Les pyrimidines exogènes pourraient être inactives parce qu'elles ne pénètrent pas ou peu dans la souche sauvage. Les données fournies par les expériences utilisant des pyrimidines exogènes radioactives sont en désaccord formel avec cette hypothèse (voir Chapitre III). Selon une autre hypothèse la souche sauvage se trouverait en état de répression maximale ou quasi maximale lorsqu'elle est cultivée sur milieu minimum liquide. La réplétion des pools de pyrimidines serait telle qu'un apport d'origine externe ne saurait réprimer davantage la synthèse des enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'UMP chez la souche sauvage.

Ces hypothèses ont été testées en agissant sur la concentration intracellulaire ("pool") de pyrimidines. D'une part, nous avons diminué cette concentration, chez la souche sauvage par culture en présence de 6-azauracile

qui bloque la décarboxylation de l'OMP en UMP, chez les souches ur^- auxotrophes par culture en présence de faibles concentrations de pyrimidines (limitation de croissance). D'autre part, afin d'augmenter le "pool" de pyrimidines exogènes nous avons cultivé les souches ur^- sur des concentrations élevées de pyrimidines. Enfin, avec la souche arg6. su16 (Fig. 19) nous avons exploité la possibilité de disposer d'un "pool" endogène de produits terminaux à concentration élevée et de le faire varier en agissant sur la production de CP, la CPSase arg étant sensible à la répression par l'arginine.

8. Action du 6-azauracile chez la souche sauvage + iso 10 (1).

a) Inhibition de croissance par le 6-azauracile

L'effet inhibiteur du 6-azauracile sur la biosynthèse des pyrimidines a été observé chez des organismes appartenant à des groupes taxonomiques très divers. L'azauracile est anabolisé en aza UMP directement ou par l'intermédiaire de l'azauridine. HANDSCHUMACHER et PASTERNAK (1958) ont montré qu'il inhibe spécifiquement la décarboxylase de l'OMP. La transformation d'OMP en UMP diminue ; il en résulte un déficit en UMP entraînant une carence en pyrimidines et en cofacteurs à noyau pyrimidique. Dans ces conditions une augmentation du taux de synthèse des enzymes de la chaîne de l'UMP par dérépression est susceptible de se manifester.

La croissance de la souche sauvage est totalement inhibée par le 6-azauracile ajouté à la concentration 8.10^{-3} M dans du milieu minimum.

b) Effet du 6-azauracile sur les enzymes de biosynthèse de l'UMP.

Nous avons comparé entre elles les activités spécifiques des enzymes d'une souche + iso 10 (1) cultivée sur milieu minimum ou sur milieu minimum additionné de 6-azauracile à deux concentrations différentes (Tableau 7).

Milieu de culture	CPSase glutamine dépendante	ATCase	DHOase	OMPPase
Mm	100	100	100	100
Mm + azauracile $4,4.10^{-4}$ M	90	183	126	-
Mm + azauracile $8,8.10^{-4}$ M	-	320	140	88

Tableau 7. Action du 6-azauracile sur la souche + iso 10 (1)

Les activités spécifiques sont exprimées en pourcentage des activités spécifiques de la souche + iso 10 (1) cultivée sur milieu minimum liquide (conditions standard).

L'interprétation la plus simple du niveau élevé d'ATCase est une dérépression du taux de synthèse de cet enzyme dûe à la déplétion du pool intracellulaire en pyrimidines, sous l'effet du 6-azauracile qui réduit le flux de produits terminaux de la voie de biosynthèse. Les résultats obtenus sont en faveur d'une répression des activités enzymatiques chez la souche sauvage cultivée sur milieu minimum liquide.

En ce qui concerne la DHOase, l'augmentation observée est nettement moins importante que pour l'ATCase. S'il s'agit de dérépression, elle n'est pas coordonnée, s'il s'agit d'une induction, elle est peu importante. L'OMPPase n'est pratiquement pas modifiée.

9. Régulation des niveaux enzymatiquez chez les souches ur^-.

Les souches ur^- sont incapables de croître sur milieu minimum ;seuls quelques mutants appartenant au groupe d'allèles ur 1 sont bradytrophes. La croissance des souches ur^- est donc conditionnée par l'addition au milieu de culture d'une source de pyrimidines. Le taux de croissance de ces souches mutées est en relation directe avec la concentration du milieu en pyrimidines jusqu'à un seuil où l'augmentation de la concentration en pyrimidines n'a plus d'effet sur le taux de croissance des ur^-. En dessous de ce seuil on considère que la croissance des ur^- est limitée par la concentration en pyrimidines. Les concentrations inférieures à ce seuil sont appelées limitantes. Ces seuils ont été déterminés pour des cultures de cinq jours sur milieu minimum solide. Ils varient légèrement selon les souches de 0,25 à $0,5.10^{-4}$ M pour l'uridine, de 0,7 à 2.10^{-4} M pour l'uracile, de 0,15 à $0,5.10^{-4}$ M pour la cytidine.

Dans un premier temps nous avons déterminé les activités spécifiques des enzymes de la chaîne de biosynthèse de l'UMP, chez des souches auxotrophes classées aux 5 loci ur du Coprin (Tableau 8). Les conditions de culture en milieu liquide utilisées pour cette détermination permettent une croissance voisine de celle de la souche sauvage. Il est peu probable, étant données les concentrations de pyrimidines employées et les durées respectives de la préculture et de la culture que les souches ur^- aient été carencées en pyrimidines.

Souche	+ iso 10	ur 1.16	ur 1.14	ur 1.5	ur 19	ur 4.21	ur 7.40	ur 13.22
ATCase	1.450	1.000	0	0	1.560	1.360	1.080	1.200*
DHOase	4.200	3.000	2.800	3.000	100	3.900	3.720	3.600
DHOdéhase	650	400	500	540	900	10	800	780
OMPPase	780	560	-	660	650	700	1	840
OMP DCase	540	420			420	650	540	0
OTCase	5.100	4.000	6.000	5.100	5.700	5.400	4.500	5.000

Tableau 8 - Activités enzymatiques des souches ur⁻

Conditions de culture : Trois jours de préculture en Mm liquide + uracile 4.10^{-4} M, puis 24 heures en Mm liquide + uridine 5.10^{-5} M. Activités spécifiques en nmoles de substrat transformé/mg protéines/heure. Les résultats concernant la DHOdéhase et l'OMP DCase ont été obtenus par PREVOST (1966).

Dosage à partir de mycélium congelé. Les extraits ont été filtrés sur colonne de Sephadex G25.

* ur 13.22 a une activité ATCase variable. (paragraphe 12)

En faisant varier dans les milieux de culture des souches ur⁻ la concentration du métabolite qui constitue l'unique source de pyrimidine de ces mutants, on agit directement sur les concentrations intracellulaires de substances qui correspondent aux produits terminaux de la chaîne de biosynthèse chez la souche sauvage. Une régulation de l'activité de la chaîne due à des variations de taux de synthèse enzymatique se traduira alors par un changement décelable d'activité spécifique des enzymes. Le processus de rétroinhibition *in vivo* n'est pas accessible au dosage *in vitro*, particulièrement après filtration sur Sephadex G25.

Dans un deuxième temps, nous avons cultivé différentes souches ur⁻ en présence de concentrations de pyrimidines susceptibles de limiter (carence) ou non (excès) leur croissance. Les temps de contact du mycélium avec les pyrimidines à concentrations élevées sont suffisamment longs pour dépasser le temps de doublement de la culture et donc, pour que des variations de taux de synthèse des enzymes soient perceptibles. Diverses conditions d'expériences ont été essayées.

Les résultats obtenus à partir de cultures longues des souches + iso 10 et ur 7.40 en milieu minimum liquide (Matériel et Méthodes, p. 3) sont décrits dans le tableau 9.

Souche	+ iso 10 (3)	+ iso 10 (3)	ur 7 (3)	ur 7 (3)
Milieu de culture concentration en uridine	0	5.10^{-4} M	0	5.10^{-4} M
ATCase	100*	86	210	95
DHOase	100*	86	114	102
DHOdéhase	100*	144	134	150
OTCase	100*	120	140	130

Tableau 9 - Effet de la carence en pyrimidine chez la souche ur 7.40 (3).

Conditions de culture : préculture trois jours sur milieu minimum liquide + uracile 3.10^{-4} M, mixage 10 secondes, puis ensemencement sur milieu minimum ou + uridine 5.10^{-4} M, 40 heures de culture.

* : unités arbitraires.

Les activités spécifiques sont exprimées en pourcentage de celle de la souche sauvage sur milieu minimum.

Chez cette souche (OMPPase$^-$) la carence en pyrimidines a pour conséquence une augmentation du niveau de l'ATCase (facteur 2,1). Des résultats analogues ont été obtenus dans les mêmes conditions pour une souche ur 19 (DHOase$^-$).

L'hypothèse la plus plausible est la dérépression de la synthèse de l'ATCase à la suite d'une carence en produits terminaux. L'éventualité d'une induction par un précurseur, le carbamylphosphate par exemple a pu être écartée. Dans cette seconde hypothèse, une souche dépourvue de CPSase ur et donc de CP ur ne manifesterait pas d'augmentation du niveau de l'ATCase dans les conditions ci-dessus ; or, l'expérience réalisée avec la souche ur 1.16 a montré une élévation de l'activité spécifique de l'ATCase (facteur 2,6).

En ce qui concerne la DHOase, LACROUTE (1966) a montré chez la Levure que l'acide uréido-succinique provoque l'induction de la DHOase chez les mutants ATCase$^-$ capables d'utiliser ce métabolite. Des mutants utilisateurs d'acide uréido-succinique ont été recherchés en vain chez le Coprin (PICHON, 1964). Toutefois, si l'A.U.S. induit la synthèse de la DHOase chez le Coprin on s'attend à trouver plus d'activité DHOase chez un mutant ur 4 (DHOdéhase$^-$), bloqué en aval de l'A.U.S. que chez un double mutant ur 1, ur 4 (ATCase$^-$ DHOdéhase$^-$) qui ne produit pas d'A.U.S. Les différences de niveau indiquées dans le Tableau 10 ne sont pas significativement différentes en ce qui concerne la DHOase. L'induction de la DHOase par l'acide uréido-succinique n'est donc

pas démontrée chez le Coprin.

Souche	ur 1.5	ur 4.6	ur 1.5,ur 4.6
ATCase	0	1.200	0
DHOase	3.700	4.700	4.010
OTCase	5.100	4.600	5.400

Tableau 10- Comparaison des activités DHOase chez des souches ur^- bloquées avant ou après l'acide uréido-succinique.

Culture réalisée dans les conditions standard. Concentration du milieu en uridine 5.10^{-5} M. Activités spécifiques en nmoles de substrat transformé par mg protéines et par heure.

Dans les conditions de culture utilisées chez le Coprin, il est techniquement difficile d'analyser la répression chez une souche ur^- au cours des 43 heures de croissance en milieu liquide, d'abord en carence puis en excès de pyrimidines : en raison de l'allongement considérable du temps de doublement provoqué par la carence en pyrimidines il est impossible d'obtenir des cultures bien développées.

Il nous a paru plus judicieux, afin que les masses de mycélium formées au cours de la croissance soient comparables, de cultiver une souche ur^- en excès de pyrimidines pour la soumettre ensuite à une carence de plus en plus longue. Pour un temps de culture de 44 heures en milieu liquide nous observons chez le souche ur 19 un facteur de dérépression de 3,5 pour l'ATCase au bout de 23 heures de carence en uracile (Tableau 11).

Temps de carence	0 h	13 h	23 h	33 h
Récolte de protéines (mg)	20,5	16,35	13	10,8
ATCase	2.070	3.500	7.050	6.350
DHOase	100	100	100	100
OMPPase	(730)	(730)	(840)	(780)

Tableau 11 Effets de la carence en pyrimidines chez la souche ur 19 (1).

Durée de chaque culture : 44 heures. 1er milieu minimum liquide + uracile 2.10^{-2} M. Les mycéliums sont transférés sur le 2ème milieu minimum liquide + uracile 10^{-5} M au bout de 11, 21 ou 31 heures. Les dosages sont effectués à partir de mycélium frais. La récolte des protéines correspond à un inoculum de 20 thalles. Activités spécifiques en nmoles de substrat transformé par mg de protéines et par heure.

Le même type d'expérience a été tenté avec une souche ur 4.6.

Des tests de croissance des souches ur^- nous ont montré que la souche ur 4.6, comme la majorité des souches ur^-, croît plus rapidement en présence d'uridine qu'en présence d'uracile alors que la souche ur 19 présente les caractéristiques inverses. La souche ur 4.6 a donc été cultivée dans des conditions analogues à celles de l'expérience précédente mais en présence d'uridine 2.10^{-2} M pour le premier milieu, 5.10^{-6} M pour le second milieu. Les temps de séjour sur le milieu pauvre en uridine sont de 0, 15, 24 et 33 heures pour une durée totale de 43 heures de culture. Nous n'avons observé aucune différence significative entre les activités spécifiques ATCase et DHOase des quatre cultures. Il est possible que les conditions de culture n'aient pas permis de carencer suffisamment la souche pour qu'une dérépression intervienne. Dans un premier temps, le mycélium placé dans le milieu concentré accumule vraisemblablement beaucoup d'uridine ; dans un deuxième temps il l'utilise pour son développement. Le premier temps étant relativement long par rapport au temps total de la culture, (10, 19 ou 28 heures pour 43 heures), la limitation de la croissance intervient tardivement. Dans ces conditions il est permis de penser qu'au moment de la récolte du mycélium les processus de régulation ne se sont pas encore manifestés de manière mesurable au niveau des activités enzymatiques.

Les expériences d'"incorporation" de pyrimidines (Chapitre III) fournissent des résultats en accord avec cette hypothèse : l'uridine est fixée 3 à 4 fois plus rapidement que l'uracile par le mycélium de Coprin. On comprend ainsi qu'à concentrations égales dans le milieu de culture, l'uridine soit capable de réprimer la biosynthèse de l'UMP plus activement que l'uracile et donc que la dérépression soit lente à intervenir quand une souche ur^- est carencée en uridine. Nous avons recherché des conditions de culture en carence en uridine qui permettent la dérépression.

10. Essais de culture sur cellophane

Nous nous sommes efforcés de réaliser des conditions de réelle carence en uridine en cultivant la souche ur 4.6 sur un milieu pauvre en uridine mais constamment renouvelé. Nous avons constitué deux lots de boîtes de Pétri contenant des thalles ensemencés sur une rondelle de cellophane posée sur le milieu gélosé.

La première culture, sur milieu minimum + uridine 5.10^{-6} M, a été transférée tous les jours sur milieu neuf pendant dix jours sauf la veille de la récolte.

La seconde culture, sur milieu minimum + uridine 2.10^{-2} M, a été transférée tous les jours sur milieu neuf pendant cinq jours. Les deux lots ont été récoltés et leurs activités enzymatiques dosées simultanément.

Les résultats de l'étude enzymatique sont consignés dans le tableau 12.

Souche ur 4.6	Poids de 100 thalles frais (mg)	ATCase	OTCase
Milieu minimum + uridine 5.10^{-6} M	391	(520)	(1.880)
Milieu minimum + uridine 2.10^{-2} M	2.390	(80)	(2.800)

Tableau 12- Activités enzymatiques de la souche ur 4.6 sur milieu minimum solide.

Activités spécifiques en nmoles de substrat transformé par mg de protéines et par heure. Dosages effectués à partir de mycélium congelé.

L'activité spécifique de l'ATCase chez la souche ur 4.6 cultivée en excès d'uridine est très basse comparée à celle de la souche ur 4.6 carencée en uridine. Le facteur de dérépression observé est 6,5. Toutefois l'activité ATCase de la souche carencée, qu'on pourrait donc croire déréprimée, est moins élevée que celle d'une souche sauvage cultivée quatre jours sur milieu minimum solide : 520 nmoles de substrat transformé/mg de protéines/heure pour la souche ur 4.6 contre 900 pour la souche + iso 10 (1). C'est donc la répression du niveau de l'ATCase en présence d'un excès d'uridine qui semble ressortir le plus clairement de ces résultats.

Cette conclusion doit être modulée par les considérations qui suivent concernant les cultures sur milieu solide. Nous avons souligné dans le Chapitre I l'hétérogénéité du milieu solide, vidé de ses substances nutritives à l'emplacement des thalles en croissance ainsi que l'hétérogénéité des thalles résultant de la malnutrition et du vieillissement de la partie centrale. Le métabolisme global d'une souche sauvage cultivée en milieu minimum solide n'est pas très actif car une partie des hyphes qui constituent son thalle manquent d'éléments nutritifs essentiels. Il est concevable que les enzymes de biosynthèse conduisant à la formation des acides nucléiques ne puissent pas y atteindre des niveaux élevés.

La souche ur^-, cultivée dans des conditions de carence sévère ne peut avoir qu'un métabolisme global encore plus réduit ; l'état de carence phy-

siologique des thalles se traduit morphologiquement par leur aspect plat et déprimé au centre. Les activités enzymatiques mesurées dans de telles conditions sont vraisemblablement sous estimées comme en témoigne l'activité peu élevée mesurée pour l'OTCase ; chez la souche ur⁻ carencée, une activité intense des enzymes protéolytiques peut être envisagée. Dans ce cas la valeur observée pour l'ATCase n'est probablement qu'une estimation peu précise.

La souche ur⁻ cultivée en présence d'un excès de pyrimidines se trouve dans une situation beaucoup plus comparable à celle de la souche sauvage en ce qui concerne le métabolisme global (croissance très légèrement inférieure à celle de + iso 10). Il semble plus légitime de comparer les chiffres 80 et 900, ce qui correspond à un coefficient de répression supérieur à 10.

La souche sauvage en milieu minimum gélosé apparaît ici beaucoup moins réprimée que la souche ur⁻ cultivée en excès de pyrimidines. La répression n'atteint donc pas un taux maximum chez la souche sauvage cultivée sur milieu minimum comme on pouvait le penser à la suite de l'échec des tentatives de répression de l'ATCase par des concentrations élevées de pyrimidines exogènes.

Avant de décrire les résultats obtenus avec la souche arg 6 su 16 nous allons aborder le cas des souches r et ur 13 dont le niveau d'aspartate transcarbamylase présente des particularités.

11. L'ATCase chez les souches r

PREVOST (1962) a obtenu ces souches par action des rayons X et de l'acide nitreux. A partir d'une souche sauvage est apparue une souche de génotype ur 1r° capable de croître en présence d'acide orotique comme seule source de pyrimidine. Aucune souche ur⁻ n'est capable d'utiliser l'acide orotique en l'absence de la mutation r°, bien que ce produit soit un intermédiaire de la voie de biosynthèse (PREVOST, 1962).

Parmi les différentes formes alléliques du gène r, nous avons étudié essentiellement r 17. Le site muté r 17 a été localisé par PREVOST (1962) sur le chromosome VII.

Le phénotype d'une souche + r 17 est très voisin de celui de la souche sauvage mais un critère immédiat permet de les distinguer : l'inhibition de croissance des souches + r 17 par les 5-fluoropyrimidines peut être levée en ajoutant de l'acide orotique dans le milieu de culture mais non l'inhibition de la souche sauvage. L'action inhibitrice des 5-fluoropyrimidines sur la croissance s'exerce de façon assez semblable chez les deux types de souches.

L'activité spécifique de l'ATCase chez les souches r 17 (4) et r 24 est moins élevée que chez la souche sauvage (Tableau 13).

Souche	+ iso 10 (1)	r 17 (4)	r 24
ATCase	100*	60	39
DHOase	100*	102	97
OTCase	100*		100

Tableau 13. Comparaison des activités enzymatiques des souches r^+ et r.

Les activités spécifiques sont exprimées en pourcentage de celles de la souche sauvage. Cultures sur milieu minimum liquide, conditions standard.
* Unités arbitraires.

Afin de savoir si cette différence d'activité mesurée in vitro avait ou non des conséquences in vivo, nous avons croisé entre elles les souches ur 6, r17 (DHOdéhase) et arg 5.11 (CPase arg^-). Nous avons obtenu des tétrades comportant des souches arg 5.11, ur 6, r17, dans les proportions attendues, les trois gènes étant indépendants. Ces souches, complètement bloquées sur milieu minimum présentent une faible croissance sur uracile ou acide orotique, ce qui n'est pas le cas des souches arg 5.11, ur 6, r^+. Le gène r 17 joue ici le rôle de suppresseur partiel du besoin en arginine créé par la mutation arg 5.11. Chez une souche r 17 une substance non déterminée réprimerait l'ATCase provoquant une accumulation du CP ur et une "fuite" de ce dernier vers la chaîne de l'arginine. Il serait intéressant de pouvoir mettre en évidence cette substance et de savoir si sa présence chez r 17 est en relation avec la capacité qu'a la mutation r 17 de permettre l'utilisation de l'acide orotique par les souches ur 1, ur 19 et ur 4.

L'étude physiologique de la souche r 17 a été entreprise par PREVOST (1962). Il a montré que l'acide orotique ^{14}C pénètre 2 à 5 fois plus vite dans les souches ur 1c, r 17 et ur 4, r 17 que dans les souches ur 1c, r^+ et ur 4, r^+. Nous avons pu vérifier chez des souches ur 19, r 17 et ur 13, r 17 (obtenues par croisement) une hypothèse émise par PREVOST (1962) : la mutation r 17 permet l'utilisation de l'acide orotique (A.O.) uniquement chez les souches pourvues des enzymes OMPPase et OMP DCase qui catalysent les transformations AO $\longrightarrow$ OMP $\longrightarrow$ UMP. Pour l'ensemble des souches ur^-, r 17 et ur^-, r^+ les réactions de croissance sont les suivantes :

Souches	Mm	Mm + uridine	Mm + acide orotique
ur 1,r^+	0	+	0
ur 19,r^+	0	+	0
ur 4,r^+	0	+	0
ur 7,r^+	0	+	0
ur 13,r^+	0	+	0
ur 1,r 17	0	+	+
ur 19,r 17	0	+	+
ur 4,r 17	0	+	+
ur 13,r 17	0	+	0

Nous avons constaté que l'augmentation de la vitesse de pénétration de l'acide orotique dans les souches présentant la mutation r 17 se manifeste aussi chez une souche ur 13,r 17 (OMP DCase$^-$) (Fig.22bis),bien qu'elle soit incapable de croître en présence de cet intermédiaire. Cette observation constitue un argument en faveur de l'intervention de l'OMPPase dans le mode d'action de la mutation r 17. Nous avons aussi cherché à analyser par chromatographie les fractions "TCA solubles" de souches ur 13 et ur 13,r 17 ayant été au contact d'acide orotique ^{14}C. Les différences observées sur les chromatogrammes semblent être essentiellement d'ordre quantitatif. D'autres expériences d'"incorporation" d'acide orotique chez des souches ur$^-$ comportant ou non la mutation r 17 sont nécessaires pour préciser le rôle de r 17 dans le métabolisme de l'acide orotique exogène.

Ayant envisagé l'existence de relations physiologiques entre l'activité OMPPase gouvernée par le gène ur 7, et le gène r 17 impliqué dans l'utilisation de l'acide orotique exogène, nous avons considéré ces relations d'un point de vue génétique. PREVOST (1962) indique une distance de 7 ± 6 unités entre ur 7 et r 17. L'analyse génétique des tétrades issues du croisement ur 4.6,r 17 x ur 7.40 nous a permis de préciser cette localisation. Sur 93 tétrades étudiées, nous avons trouvé 32 tétrades ne comportant aucune souche formée par recombinaison entre ur 4.6 et ur 7 (tétrades où aucune spore ne se développe en milieu minimum). Dans ces 32 tétrades

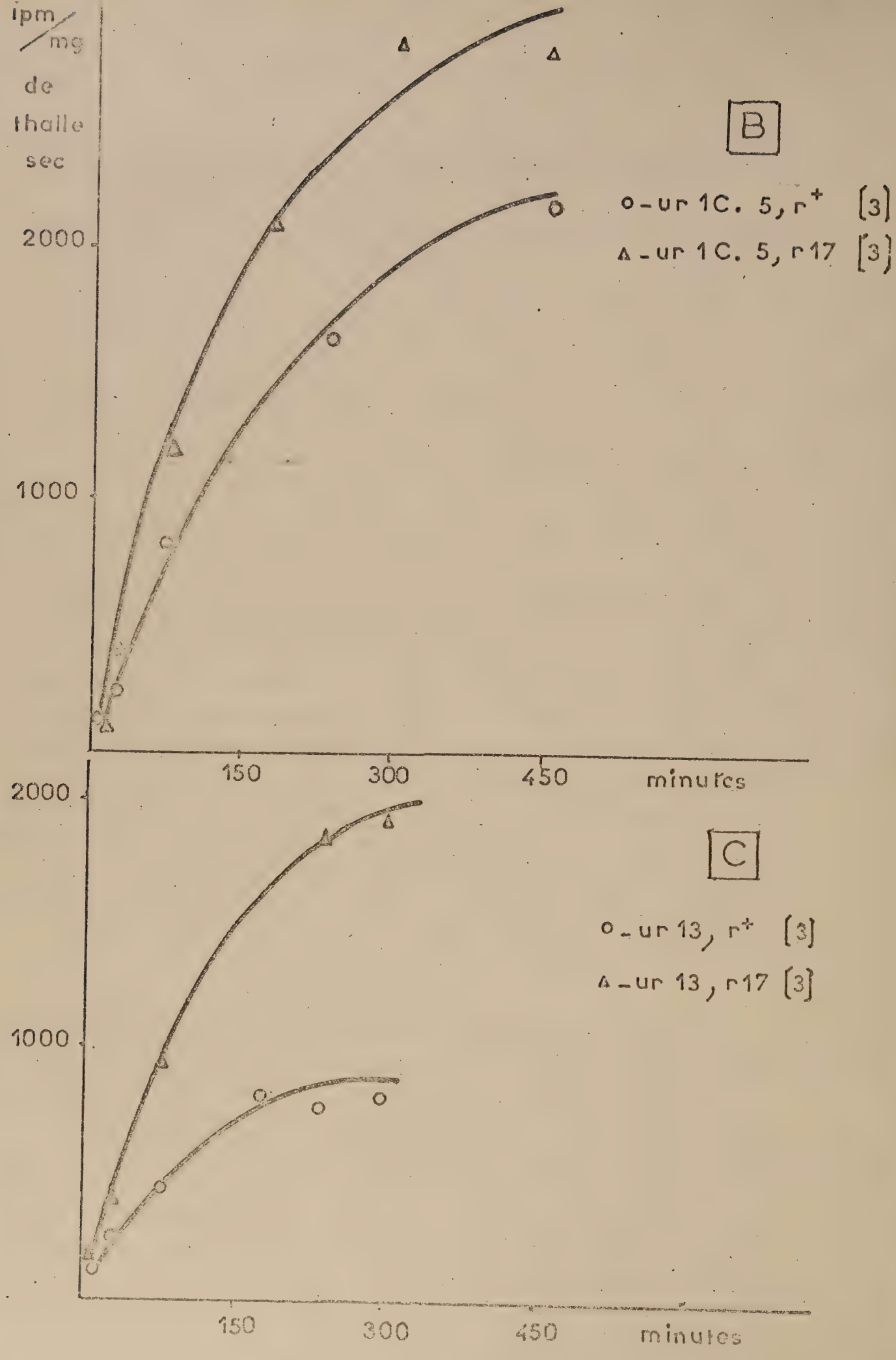


Figure 22 bis - Incorporation d'acide orotique ^{14}C-2

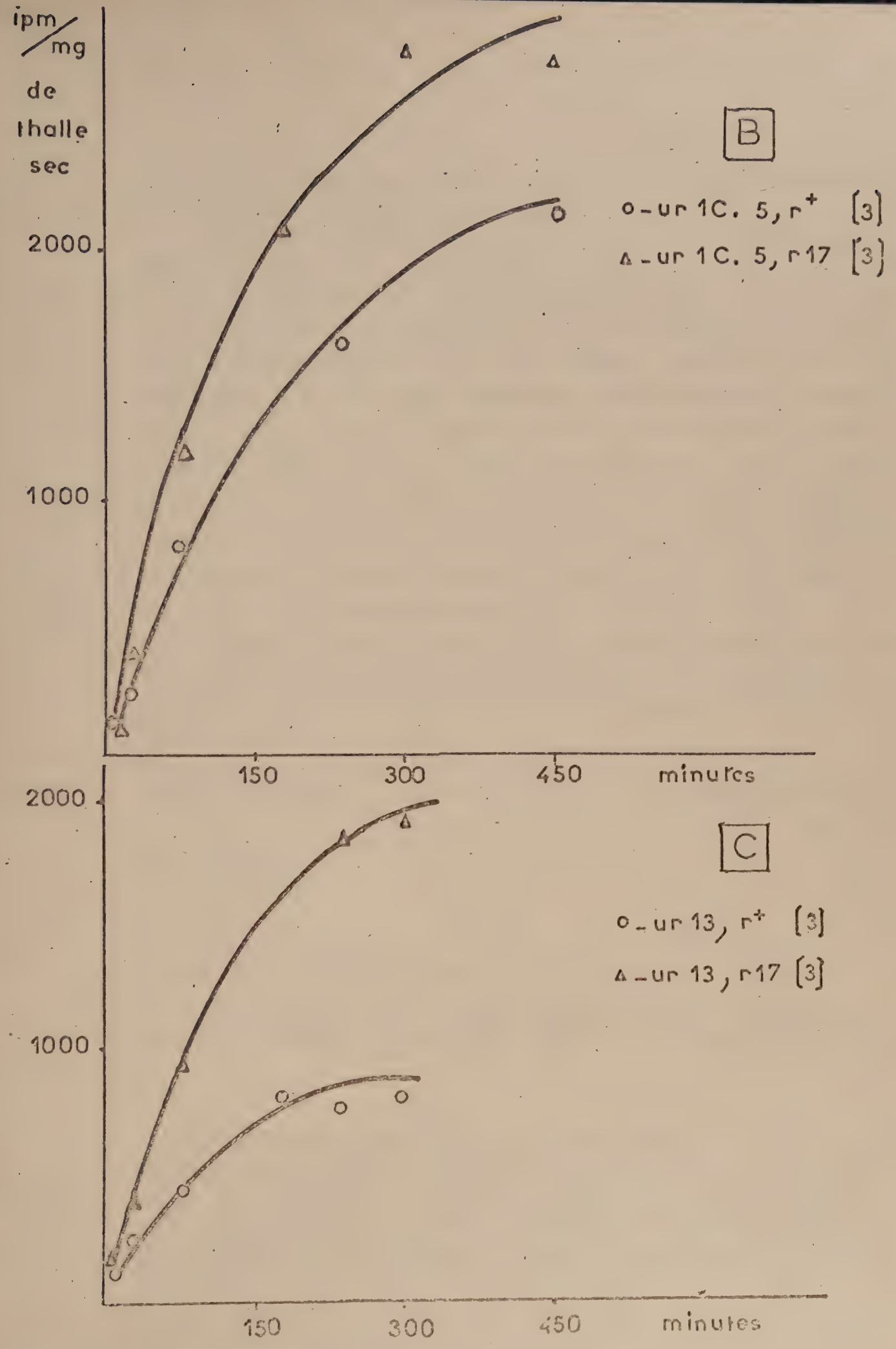


Figure 22 bis - Incorporation d'acide orotique ^{14}C-2

aucune recombinaison entre les loci ur 7 et r n'a été mise en évidence, ce qui correspond à un pourcentage de recombinaison inférieur à 1 %.

La mutation r 17 affecte donc soit le gène ur 7 qui contrôle l'activité OMPPase, soit une région très proche de ce gène.

L'étude enzymatique de l'OMPPase menée simultanément chez des souches r 17 et r^+ a fourni les indications suivantes : en présence d'acide orotique à la concentration 3.10^{-4} M le niveau OMPPase d'une souche + r 17 est supérieur de 30 % à celui de la même souche cultivée en milieu minimum ; chez une souche ur 1.5,r 17 (CPSase ur^-,$ATCase^-$,utilisatrice d'A.O.) cultivée en présence d'uridine à concentration limitante, l'adjonction d'acide orotique 2.10^{-4} M dans le milieu de culture est suivie d'une augmentation d'activité spécifique de l'OMPPase peu significative puisque à peine supérieure à 10 % ; chez une souche ur 13,r 17 l'augmentation d'activité de l'OMPPase due à la présence d'acide orotique dans le milieu de culture n'a pas été trouvée de manière constante.

Les résultats sont plus nets en ce qui concerne l'effet d'inhibiteurs sur l'activité OMPPase. L'OMPPase de la souche r 17 est moins sensible que celle de la souche + iso 10 à la rétroinhibition in vitro par le CTP (Tableau 13bis).

Mélange réactionnel	% d'acide orotique ^{14}C transformé/mg protéines/heure		
	+ iso 10	r 17	FUR 0.1
Sans inhibiteur	122	152	113
+ UTP $1,5.10^{-2}$ M	44 (64)	70 (53)	35 (69)
+ CTP 4.10^{-2} M	40 (67)	113 (26)	-

Tableau 13bis. Effet inhibiteur de l'UTP et du CTP sur l'OMPPase

Les cultures ont été effectuées dans les conditions standard. Chaque tube réactionnel contient 450 nmoles d'acide orotique ^{14}C-2 et 300 µg de protéines. Le pourcentage d'inhibition est figuré entre parenthèses.

Des expériences complémentaires sont nécessaires pour préciser les modifications de l'OMPPase intervenant chez les souches r 17, notamment celles des constantes d'affinité. De telles modifications sont probablement responsables de la capacité d'utiliser l'acide orotique exogène ; l'enzyme paraît plus accessible à ce substrat quelle qu'en soit l'origine

ce qui pose le problème de la localisation cytologique de l'OMPPase (ou de la "compartimentation" de l'acide orotique).

Les niveaux peu élevés de l'ATCase chez les souches + r 17 peuvent être interprétés comme étant la conséquence d'une répression de la synthèse de cet enzyme par un des produits terminaux ou éventuellement de l'OMP.

12. Action de l'acide orotique chez la souche ur 13.22

Lors des dosages de l'ATCase chez la souche ur 13.22 nous avons été surpris par l'amplitude importante des variations de cette activité enzymatique (ordre de grandeur : de 700 à 1200 unités sur milieu Mm + uracile 2.10^{-4} M), alors que d'autres activités mesurées en même temps restent constantes dans les conditions standard de culture.

En présence d'acide orotique 2.10^{-4} M dans le milieu de culture l'activité ATCase de la souche sauvage reste inchangée tandis que chez ur 13 on observe une diminution d'activité supérieure aux variations signalées précédemment. Cette réduction d'activité par rapport à celle de la même souche, cultivée simultanément sur milieu minimum + uridine 5.10^{-5} M, va de la moitié au dixième.

On sait par ailleurs (paragraphe 11) que l'acide orotique n'est pas utilisé par une souche ur 13 et qu'il en est de même pour les souches ur 13,r 17. L'interprétation du rôle de l'acide orotique dans le changement de niveau de l'ATCase est extrêmement malaisée. Il est improbable qu'il s'agisse d'une action directe par dégradation de la protéine enzymatique car cet effet se manifesterait chez n'importe quelle souche cultivée en présence d'acide orotique. La souche ur 7 ($OMPPase^-$) qui accumule l'acide orotique devrait être particulièrement affectée, or, il n'en est rien.

Le genre d'hypothèse que l'on peut émettre concerne une éventuelle influence de l'acide orotique venu de l'extérieur sur les interconversions entre l'acide orotique, l'orotidine et l'OMP. L'un de ces trois produits interviendrait dans un système régulant la synthèse de l'ATCase.

D - LES ENZYMES DE BIOSYNTHESE DE L'UMP CHEZ LA SOUCHE arg 6. su16. UN CAS D'AUTOREPRESSION

La souche arg 6. su16 a été obtenue par irradiation aux U.V. de mycéliums ur 1a (CABET, GANS, HIRSCH, PREVOST, 1965) ; ce mutant a été sélectionné comme suppresseur de la mutation ur 1a.16 située dans le locus qui gouverne l'activité carbamylphosphate synthétase de la voie de biosynthèse de l'UMP. Le gène muté arg 6. su16, bien qu'il n'entraîne pas d'auxotrophie pour l'arginine, est allèle du gène arg 6 gouvernant l'activité ornithine transcarbamylase. La souche arg 6. su16 est bradytrophe ; l'adjonction d'arginine dans le milieu de culture améliore son développement. L'étude enzymatique des extraits du mutant arg 6. su16 montre que leur activité OTCase est très réduite, environ 1/60ème de l'activité de la souche sauvage. L'effet suppresseur de ur 1a.16, (CPSase ur$^-$) est expliqué par une accumulation de CParg dont l'utilisation par la chaîne de l'arginine est ralentie par le bloc partiel de l'OTCase sous l'effet de la mutation arg 6. su16. Le carbamylphosphate arg est utilisé comme substrat de l'ATCase et la biosynthèse d'UMP peut avoir lieu : la souche ur 1a.16, arg 6. su16 est prototrophe pour les pyrimidines (Fig. 19A). Chez la souche arg 6. su16, l'accumulation de CParg aurait deux origines : sa synthèse accrue par dérépression de la CPSase arg et son utilisation ralentie dans la chaîne de l'arginine (CABET et Coll., 1965). CALLEN (1972) a mis en évidence chez arg 6. su16 cultivé en milieu minimum un "pool" d'arginine plus faible que chez + iso 10 et une activité CPase arg plus élevée. La répression par l'arginine se manifeste chez cette souche par une diminution de l'activité spécifique de la CPase arg (CABET, 1967 ; CALLEN, 1972). Cette répression est probablement responsable de l'action inhibitrice de l'arginine observée par CABET et Coll. (1965) sur la croissance des souches ur 1a.16, arg 6. su16 cultivées en l'absence de pyrimidine.

Nous avons comparé entre eux les taux de croissance des souches arg 6. su16 et de la souche sauvage cultivées en présence de 5 fluoropyrimidine. Les souches arg 6. su16 sont moins sensibles que la souche sauvage à l'action inhibitrice des 5 -fluoropyrimidines (Chapitre III). L'hypothèse la plus simple est celle d'une surproduction de pyrimidines par les souches arg 6. su16. Les mesures d'accumulation d'A.U.S. chez les souches ur 19 (DHOase$^-$) et ur 19, arg 6. su16 ont fourni des résultats en faveur de cette interprétation (MOTTA, résultats non publiés ; CALLEN, 1968). La quantité de CParg mise à la disposition de l'ATCase (chaîne de l'UMP)

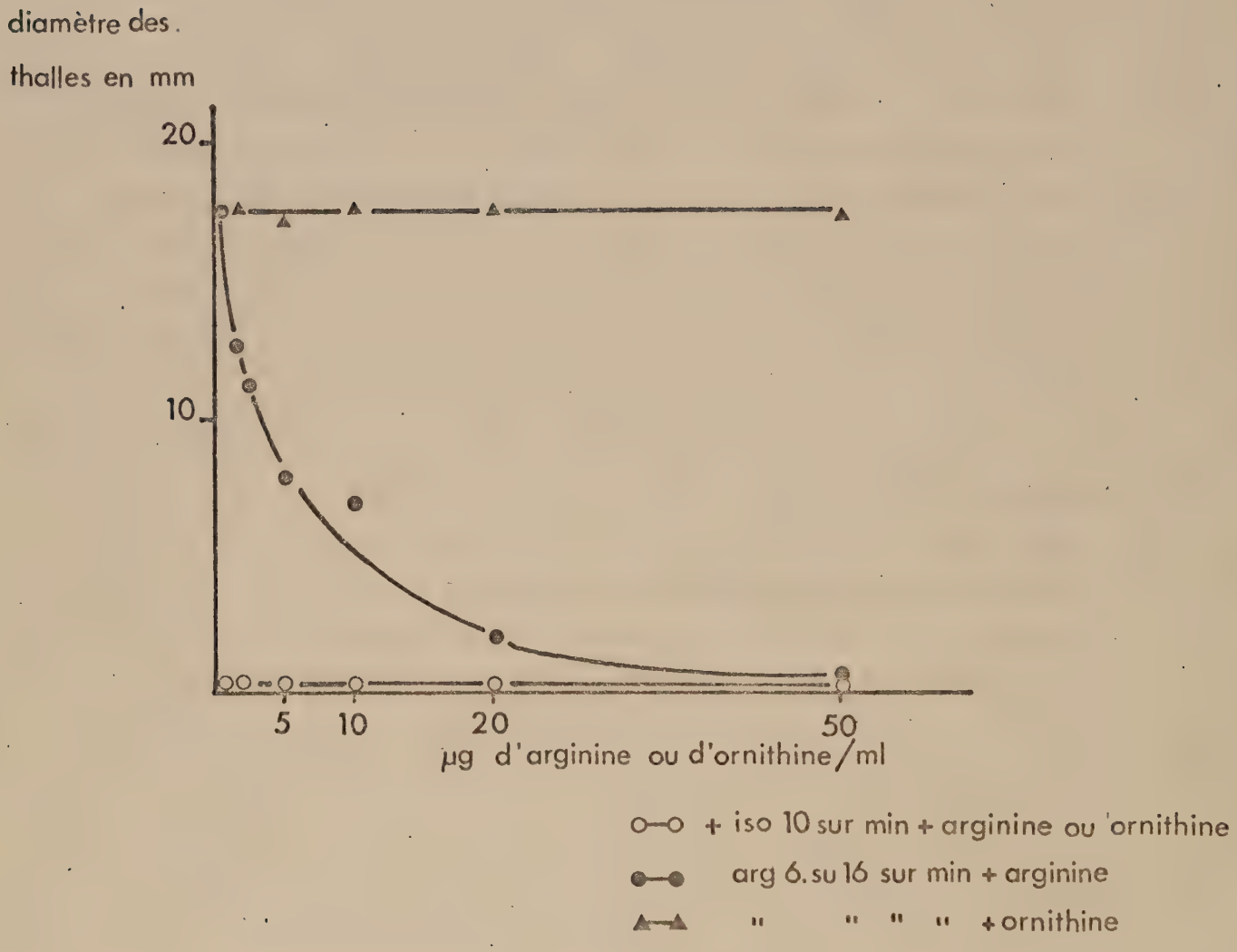


fig. 23 - Influence de l'arginine sur la résistance de la souche arg6.su16 au 5 fluorouracile 1.10^{-7} M

étant réduite par l'arginine qui réprime la CPase arg on prévoit une diminution de la production de pyrimidines par la souche arg 6. su16 en présence d'arginine dans le milieu de culture ; par voie de conséquence, sa résistance à l'action inhibitrice des 5 fluoropyrimidines doit diminuer. Les résultats présentés dans la figure 23 confirment cette prévision

L'étude enzymologique de la souche arg 6. su16 nous offre une nouvelle possibilité d'aborder les problèmes posés par la régulation de la biosynthèse de l'UMP. Nous avons constaté qu'il n'est pas possible de réprimer les enzymes de la chaîne de l'UMP en cultivant la souche sauvage en milieu liquide en présence de concentrations élevées de pyrimidines. Cela pouvait suggérer que les enzymes de la chaîne considérée se trouvent à un niveau de répression maximale chez la souche sauvage. Dans cette hypothèse, la souche arg 6. su16, bien qu'elle produise plus de pyrimidines que la souche sauvage grâce aux deux sources de carbamylphosphate (CPur + CParg) disponibles par l'ATCase chez ce mutant, pourrait ne pas posséder de niveaux enzymatiques plus bas que ceux de la souche + iso 10. Cependant les résultats de l'étude enzymatique décrits dans le tableau 14 révèlent des différences de niveaux considérables entre la souche arg 6. su16 et la souche + iso 10. Ces différences ne concernent pratiquement que l'ATCase qui serait donc l'objet principal de la régulation dans la voie de biosynthèse de l'UMP chez le Coprin. Des informations supplémentaires sur la CPSase ur sont nécessaires pour tirer une conclusion plus définitive.

Souches	Milieu	OTCase	ATCase	DHOase	OMPPase
+ iso 10 (1)	Mm	4.900	2.490	3.300	740
	Mm + arginine $1,2.10^{-4}$ M	4.800	2.170	3.100	700
arg 6. su16	Mm	50	340	3.000	800
	Mm + arginine $1,2.10^{-4}$ M	50	1.850	2.900	870

Tableau 14 - Comparaison des niveaux enzymatiques de la voie de biosynthèse de l'UMP chez + iso 10 (1) et arg 6. su16.

Cultures : conditions standard. Activités spécifiques exprimées en nmoles de substrat transformé par mg de protéines et par heure.

En l'absence d'arginine le niveau de l'ATCase chez la souche arg 6. su16 est sept fois moins élevé que celui de la souche sauvage. Le niveau d'ATCase de la souche sauvage n'est donc pas un niveau de répression maximale, ce que suggéraient déjà les résultats des expériences de culture sur cellophane. Il serait intéressant de trouver la raison pour laquelles les pyrimidines d'origine biosynthétique permettent une répression plus efficace (cas de arg 6. su16) que les pyrimidines provenant de milieu de culture.

Après avoir mis en évidence la répression de la synthèse de l'ATCase nous avons abordé le problème de la régulation de la voie de biosynthèse de l'UMP par rétroinhibition.

E - ACTION DE METABOLITES PYRIMIDIQUES *in vitro*.

Action sur l'ATCase.

Une série de dosages effectués dans les conditions habituelles de mesure de l'activité ATCase indiquent que l'UTP, le CTP, l'UMP, l'OMP, l'uridine sont capables d'inhiber l'ATCase *in vitro* (Tableau 15). Au cours des mêmes expériences nous n'avons pas observé d'inhibition de la DHOase.

Les taux d'inhibition obtenus sont faibles. Au cas où le site d'inhibition serait altéré au cours de l'extraction, l'addition d'UTP dans le "culot" de mycélium pourrait avoir un effet protecteur. L'expérience montre que cette protection est peu efficace, mais nous avons constaté que la sensibilité de l'enzyme à l'inhibition est préservée par l'UTP : en l'absence d'UTP, elle disparaît complètement en quatre heures pour des extraits "séphadexés" conservés dans la glace.

Nous avons fait varier le pH de la réaction de 7,5 à 9,5 sans augmenter le pourcentage d'inhibition. En diminuant la concentration de l'aspartate dans le mélange réactionnel (tableau 15bis) nous avons constaté une augmentation du pourcentage d'inhibition par l'UTP.

En incubant le mélange réactionnel à 4°C au lieu de 28°C on observe une augmentation peu importante de l'action inhibitrice de l'UTP et du CTP.

Action sur l'OMPPase.

L'UTP à la concentration $1,5.10^{-2}$ M dans le mélange réactionnel inhibe 50 % de l'activité OMPPase et le CTP 4.10^{-2} M 67 %.

Tableau 15. Effet d'inhibiteurs sur l'activité de l'ATCase *in vitro*.

Extraits de mycélium congelé + iso 10 (1).
Cultures : conditions standard. Les pourcentages d'inhibition sont indiqués entre parenthèses.
ES : extrait "séphadexé" ; ES (UTP) au moment du broyage on a ajouté dans le culot mycélien de l'UTP à la concentration 5.10^{-4} M. EB : extrait brut. Chaque tube réactionnel comporte 150 µg de protéines.

Tableau 15 bis. Effet de la concentration en aspartate du mélange réactionnel sur l'inhibition de l'ATCase par l'UTP.

L'extrait a été préparé à partir de mycélium congelé de souche + iso 10 cultivée dans les conditions standard. Chaque tube réactionnel contient 150 µ protéines.

TABLEAU 15

inhibiteur	concentration de l'inhibiteur	nanomoles AUS formées en 30 mn			
		ES (UTP)		ES	
0		138	(0)	130	(0)
UTP	1,7 mM	131	(5)	122	(6)
	10 mM	117	(15)	113	(13)
	15 mM	103	(25)	108	(17)
	20 mM	85	(38)	97	(25)
CTP	1,6 mM	133	(3)		
	20 mM	117	(15)		
UTP + CTP	10 mM	69	(50)		
OMP	15 mM			104	(20)
				EB	
0				70	(0)
UMP	10 mM			42	(40)
uridine	1 mM			65	(7)
	5 mM			53	(23)
	10 mM			45	(35)

TABLEAU 15 bis

concentration du mélange réactionnel en aspartate		36 mM	18 mM	9 mM	4,5 mM	2,25 mM
nanomoles d'AUS formées en 30 mn	sans UTP	141	99	40	30	14
	avec UTP 15 mM	117	72	28	19	8
% d'inhibition		17	27	30	35	43

F- POSSIBILITE DE REGULATION PAR RETROINHIBITION *in vivo*. SCHEMA GENERAL DE LA REGULATION

Les effets observés *in vitro* sont faibles, surtout en ce qui concerne l'ATCase. Ils ne peuvent agir sur le fonctionnement *in vivo* de la chaîne de biosynthèse de l'UMP que si l'ATCase fonctionne dans des conditions très éloignées de la saturation en substrat ou encore si les concentrations en inhibiteurs sont très élevées dans le région de la cellule ou se trouve localisée l'ATCase. Rappelons que chez *Neurospora* BERNART et DAVIS (1972) ont localisé l'ATCase au niveau du noyau (peut-être dans le nucléole).

Il est également possible que la CPSase ur, soit, elle aussi sensible à la rétroinhibition. Ce point reste à déterminer. L'obtention chez *C. radiatus* d'un mutant ur 1.67 dont les caractéristiques physiologiques suggèrent qu'il possède une CPSase superinhibable et qui se trouve localisé à la limite des régions ur 1a (CPSase ur) et ur 1b (ATCase) permet d'envisager l'existence d'une zone régulatrice commune à l'ATCase et à la CPSase ur. Cette hypothèse est hasardeuse dans le cas du Coprin ; par contre cette situation est possible chez la Levure (DUPHIL-DENIS, thèse, 1973).

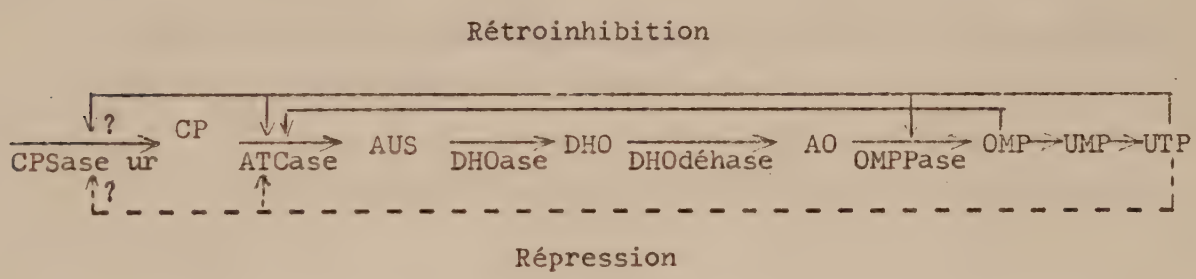


Figure 24- Schéma des mécanismes de régulation de la chaîne de biosynthèse de l'UMP chez le Coprin.

CHAPITRE III

ETUDE DU METABOLISME DES PYRIMIDINES EXOGENES

La régulation de la biosynthèse de l'UMP chez le Coprin faisant intervenir des pyrimidines qui peuvent provenir du milieu extérieur, l'analyse des mécanismes de régulation impose l'étude de la pénétration et du devenir des métabolites pyrimidiques externes.

La possibilité de supprimer la létalité de mutants ur^- chez divers organismes prouve que l'UMP peut être formée par une autre voie que celle de l'acide orotique.

I - ETUDE PHYSIOLOGIQUE DU METABOLISME DES PYRIMIDINES EXOGENES CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE ET CHEZ LES SOUCHES ur^-.

A - "Incorporation" de pyrimidines ^{14}C par la souche sauvage et les souches ur^-.

Nous avons mesuré l'incorporation de pyrimidines marquées par la souche + iso 10 (1).Chez des thalles placés au bout de 4 Jours de culture sur milieu "Mm" solide en présence d'uracile ^{14}C-2,10^{-4}M, la radioactivité globale des mycéliums par mg de protéines augmente très rapidement jusqu'à 3 heures et atteint un plateau vers 7 heures (fig. 25). La première partie de la courbe pourrait correspondre au "remplissage" d'un "pool" échangeable et à l'incorporation de produits marqués dans les macromolécules (ARN et ADN), la seconde, vraisemblablement à un état d'équilibre entre les entrées et les sorties de pyrimidines.

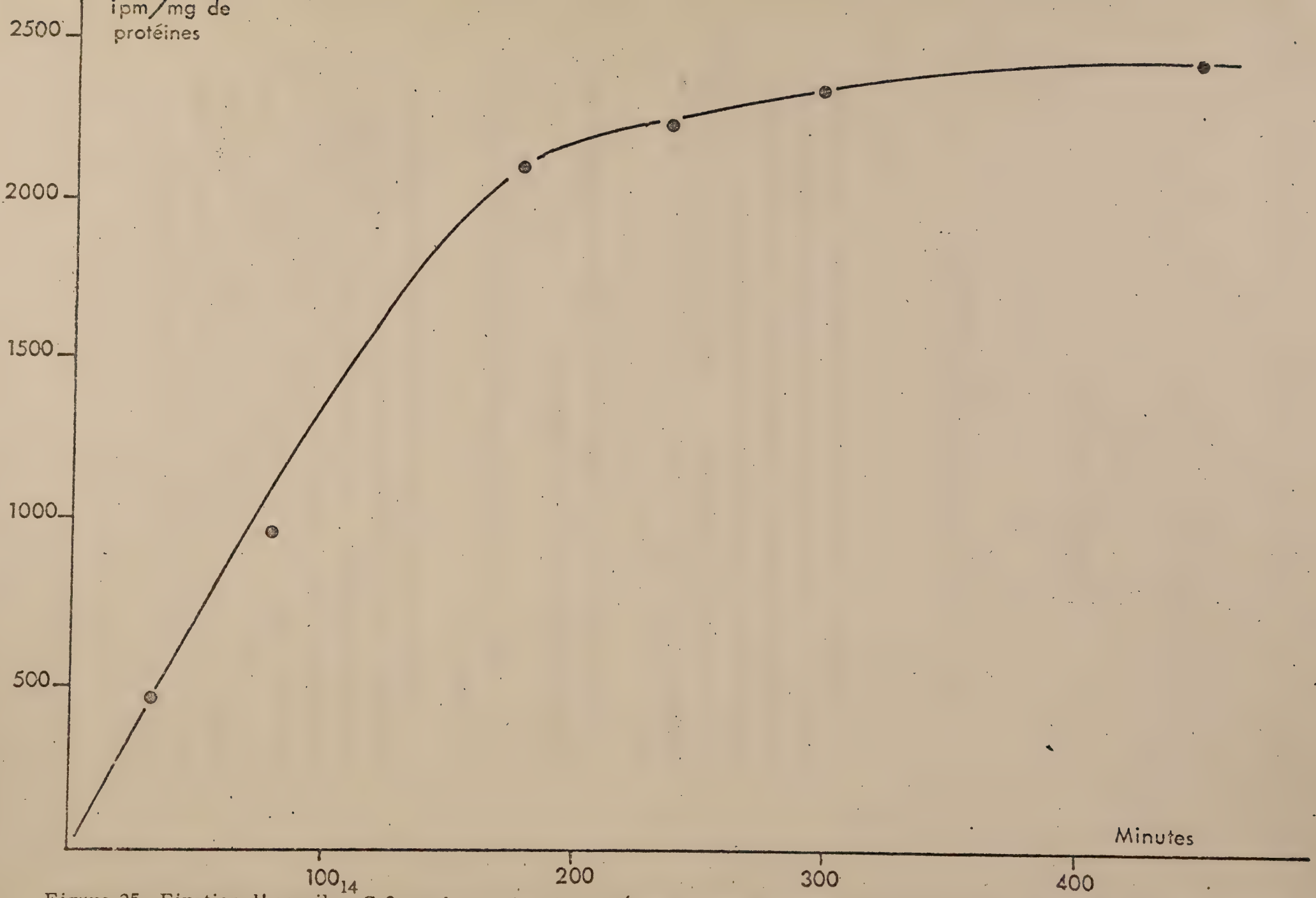


Figure 25 -Fixation d'uracile ^{14}C-2 par la souche +iso 10. (Des thalles âgés de 4 jours ont été placés au temps O sur milieu Mm + uracile 14-C, 2.10^{-4}M; la radioactivité du milieu est 350ipm/nmole; les protéines constituent environ 40% du poids des thalles secs.

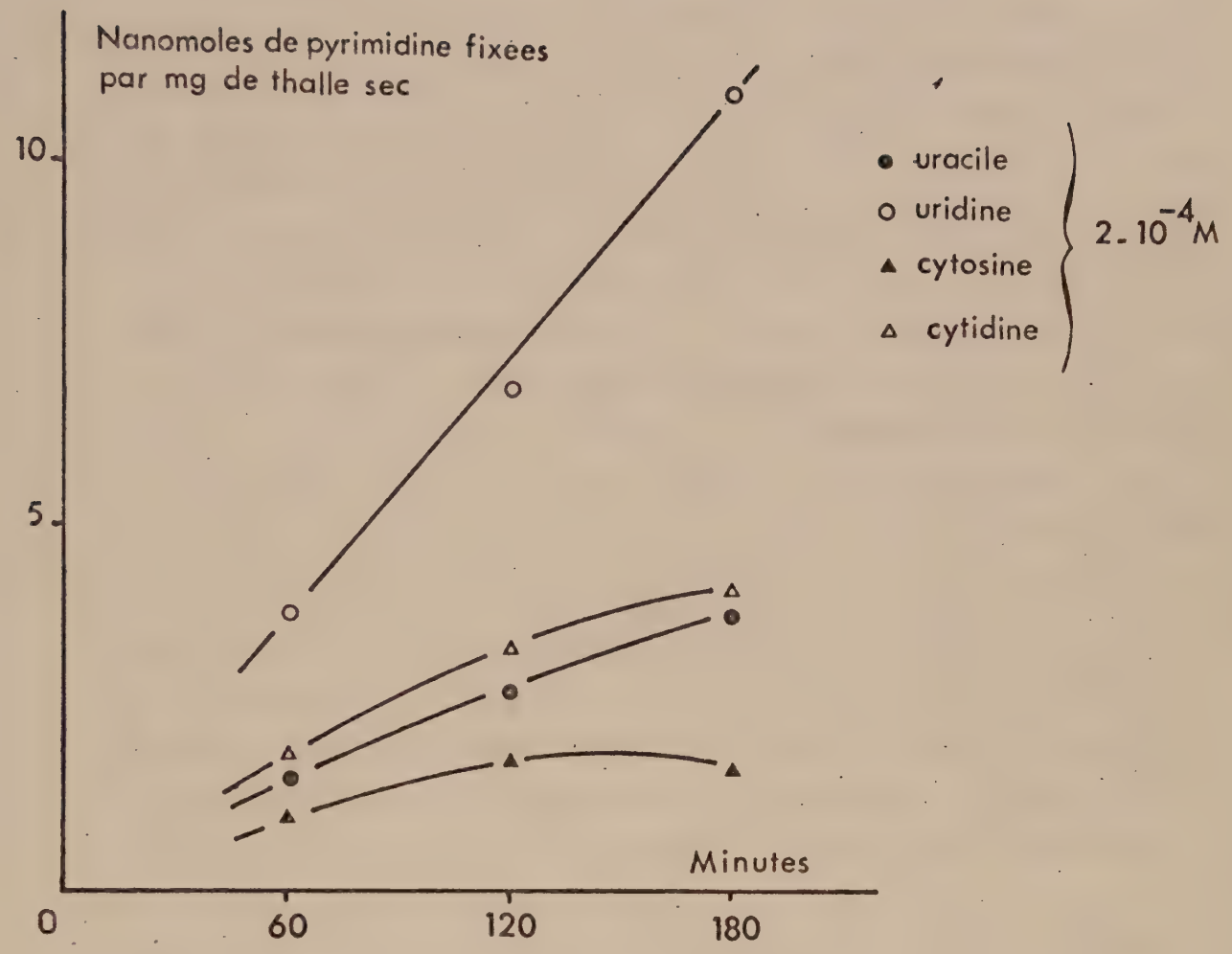


Figure 26 - Fixation de pyrimidines ^{14}C par la souche + iso 10

L'incorporation a eu lieu en milieu minimum gélosé + pyrimidine ^{14}C ; Les thalles sont âgés de 4 jours au temps 0.

Au bout de 7 heures de contact avec le milieu contenant l'uracile ^{14}C la radioactivité d'un thalle, pour une concentration du milieu de culture $2.10^{-4}M$, correspond à 7 nanomoles "d'uracile $^{14}C2$" par mg de protéines. Cette formulation implique qu'au moins 7 nanomoles d'uracile par mg de protéines ont pénétré dans le mycélium, sans préjuger des transformations subies par l'uracile ni éventuellement de la sortie de pyrimidines sous une forme dégradée ou non. Dans le cas où les thalles proviennent d'inoculums ensemencés sur milieu radioactif (chapitre I), la radioactivité du mycélium sauvage récolté au bout de 96 ou 120 heures correspond respectivement à 6, 8 et 6,4 nanomoles "d'uracile $^{14}C2$" par mg de protéines. Dans plusieurs expériences nous avons utilisé ce mode de culture sur milieu radioactif, de l'ensemencement à la récolte, afin de placer toutes les souches dans des conditions qui sont celles des mutants ur^- cultivés en présence d'uracile. Cette technique a l'avantage de fournir des résultats très reproductibles et bien caractéristiques des différentes souches: elle a permis de classer les mutants résistants aux 5-fluoropyrimidines. Toutefois les valeurs obtenues ne fournissent pas d'indications sur la cause initiale des différences observées entre les souches car elles résultent d'interaction entre de multiples phénomènes: perméation, interconversions, incorporation dans des molécules en cours de synthèse et éventuellement excrétion dans le milieu de culture.

Les quantités d'uracile, d'uridine, de cytosine et de cytidine fixées par la souche sauvage ont été comparées (fig. 26) chez des thalles en voie de croissance exponentielle. Au cours de 3 heures de contact avec le milieu radioactif, la radioactivité des thalles augmente plus rapidement en présence d'uridine qu'en présence de cytidine ou d'uracile marqués. Chez la levure les mesures de vitesse de pénétration (GRENSON, 1969) permettent de classer les pyrimidines par ordre décroissant de vitesse de pénétration: cytosine puis cytidine, uridine, uracile; chez le Coprin un classement analogue donne l'ordre: uridine, cytidine, uracile, cytosine.

Nous avons cherché à établir la relation entre la vitesse de fixation des différentes pyrimidines, leur efficacité à supplémenter les souches ur^- et les étapes de leur transformation en UMP.

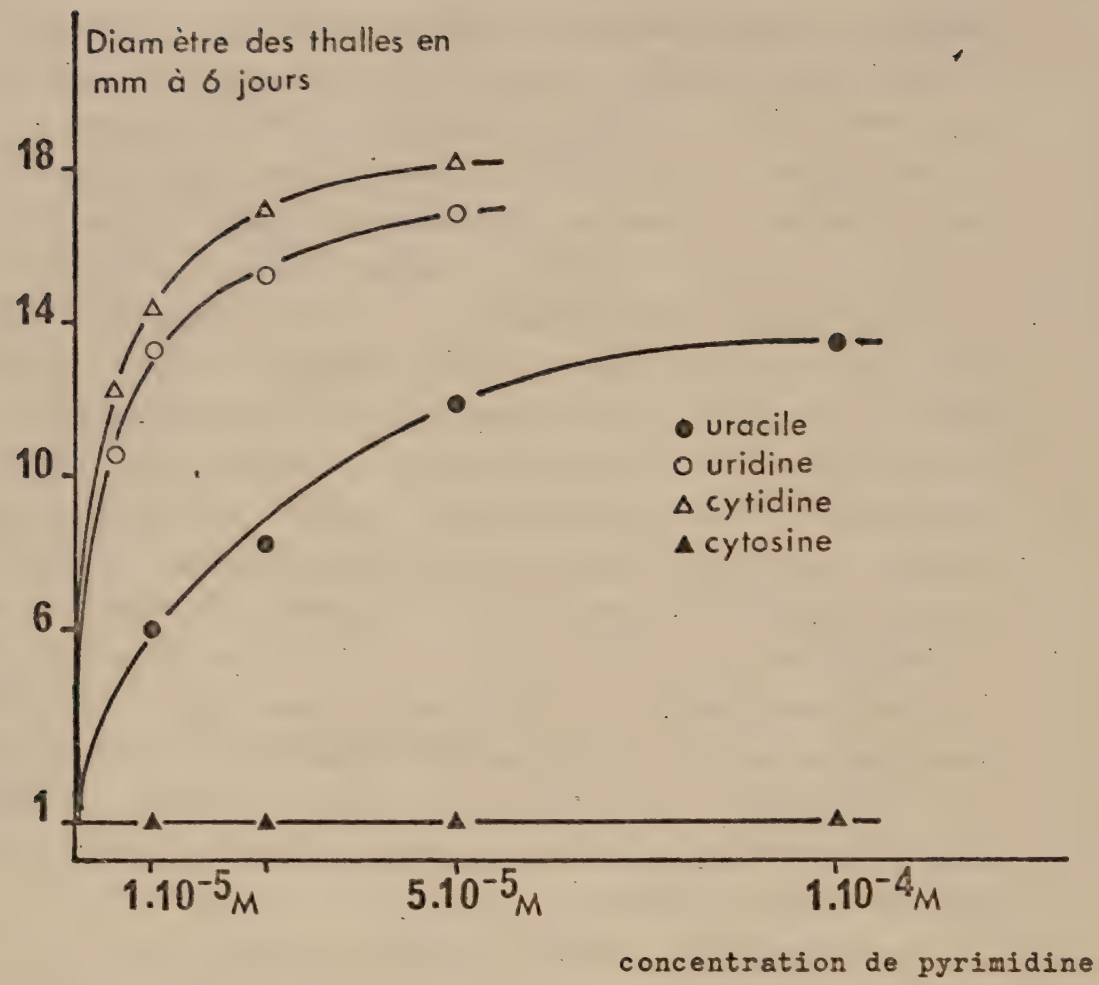


Figure 27 - Croissance des souches pyrimidine-exigeantes en fonction de la concentration du milieu de culture en uracile, uridine, cytosi ou cytidine.

Les diamètres indiqués sont la moyenne des diamètres de thalle appartenant à 10 souches ur⁻ différentes x 4 (pour chacune, des thalles des 4 signes de compatibilité sexuelle ont été cultivés).

B - Aptitude des différentes pyrimidines à supplémenter les souches ur$^-$.

Des souches ur$^-$, incapables de croître sur milieu minimum en raison d'un bloc enzymatique dans la voie de biosynthèse de l'UMP ont été cultivées sur différentes sources de pyrimidines; leurs courbes de croissance ont été tracées (fig. 27) ces résultats permettent de classer les pyrimidines par ordre d'efficacité décroissante: la cytidine puis l'uridine, à peine moins efficace, permettent une croissance plus rapide des souches ur$^-$ que l'uracile à la même concentration. La cytosine, la thymine, la thymidine, ne sont pas utilisées comme sources de noyau pyrimidique par les souches ur$^-$ du Coprin (PREVOST, 1962). Chez la Levure la situation est un peu différente: l'uracile, la cytosine et l'uridine sont utilisés efficacement, tandis que la cytidine est peu utilisée et que la thymine ou la thymidine ne permettent aucune croissance des souches auxotrophes pour les pyrimidines. Chez Neurospora (WILLIAMS, MITCHELL, 1969) l'uridine et la cytidine sont les sources de pyrimidines généralement utilisées pour supplémenter les ur$^-$.

En comparant chez le Coprin l'aptitude des différentes pyrimidines à supplémenter les souches ur$^-$ avec leur vitesse de fixation on constate que la cytosine pénètre dans le mycélium mais n'est pas utilisée. L'efficacité de chaque pyrimidine pour supplémenter les ur$^-$ dépend non seulement de sa pénétration mais aussi du déroulement des étapes ultérieures de son métabolisme.

Nous avons recherché des mutants capables d'utiliser la thymine ou la thymidine à partir de spores ur$^-$ (ur 4 et ur 7) traitées par les rayons U.V. Les spores traitées ont été ensemencées sur un milieu sélectif contenant de l'uridine, de la thymine et de la thymidine 10^{-4}M. Après deux repiquages sur le même milieu le phénotype des thalles obtenus a été examiné par réplique sur milieu minimum, Mm + uridine 10^{-4}M, Mm + thymine 10^{-4}M et Mm + thymidine 10^{-4}M. Aucune souche auxotrophe pour la thymine ou pour la thymidine n'a pu être isolée. Un tel résultat peut avoir pour cause l'absence chez le Coprin d'enzymes capables de métaboliser la thymine ou la thymidine: thymidine ribohydrolase ou phosphorylase; thymidine kinase ou enzyme de méthylation.

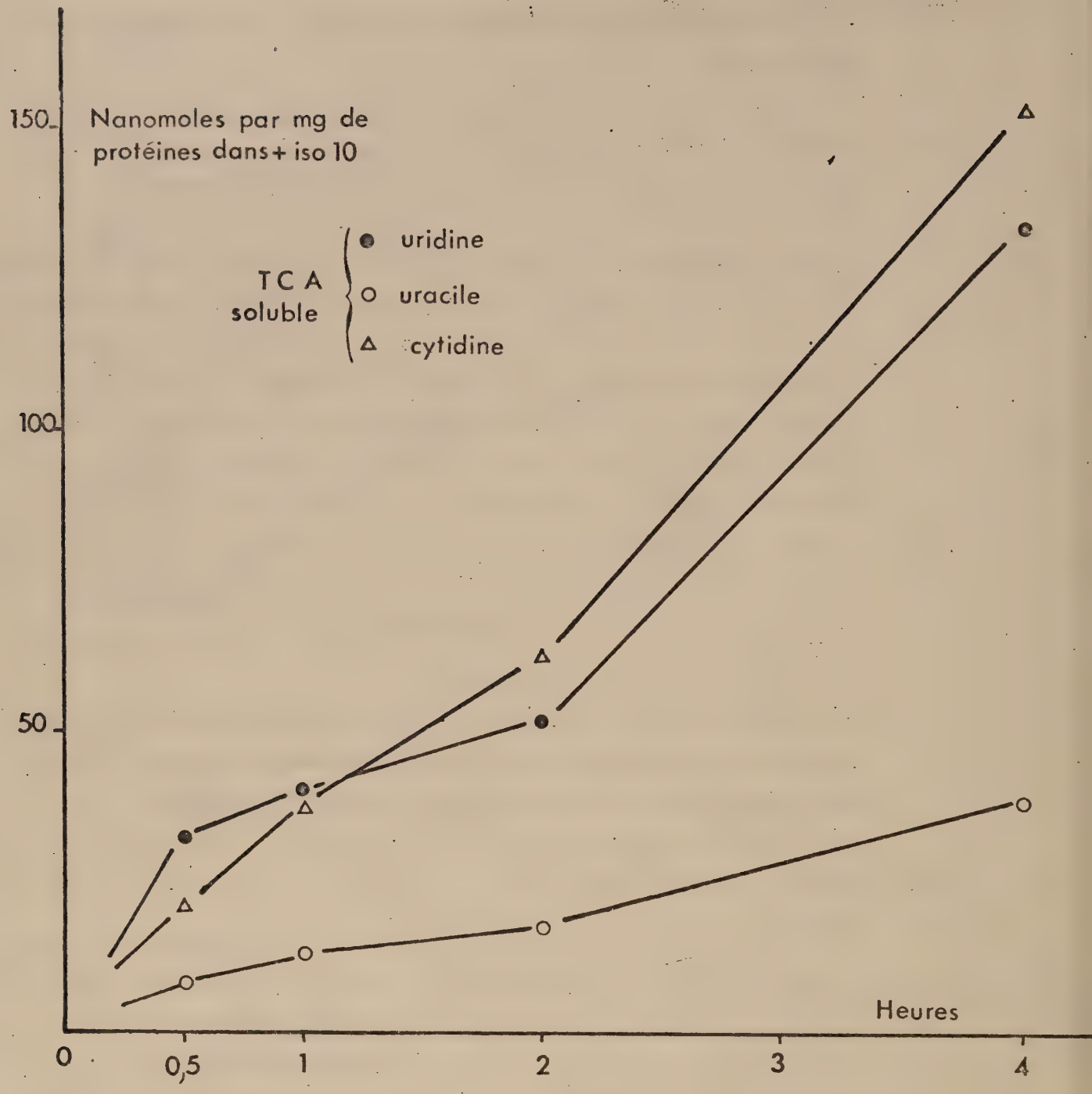


Figure 28 - Incorporation de pyrimidines ^{14}C dans la fraction TCA soluble de la souche sauvage + iso 10.

Les cultures ont été effectuées en milieu liquide dans les conditions standard.
Les pyrimidines radioactives ont été ajoutées au milieu de culture:
1/2 heure, 1, 2, 3 ou 4 heures avant la récolte du mycélium.

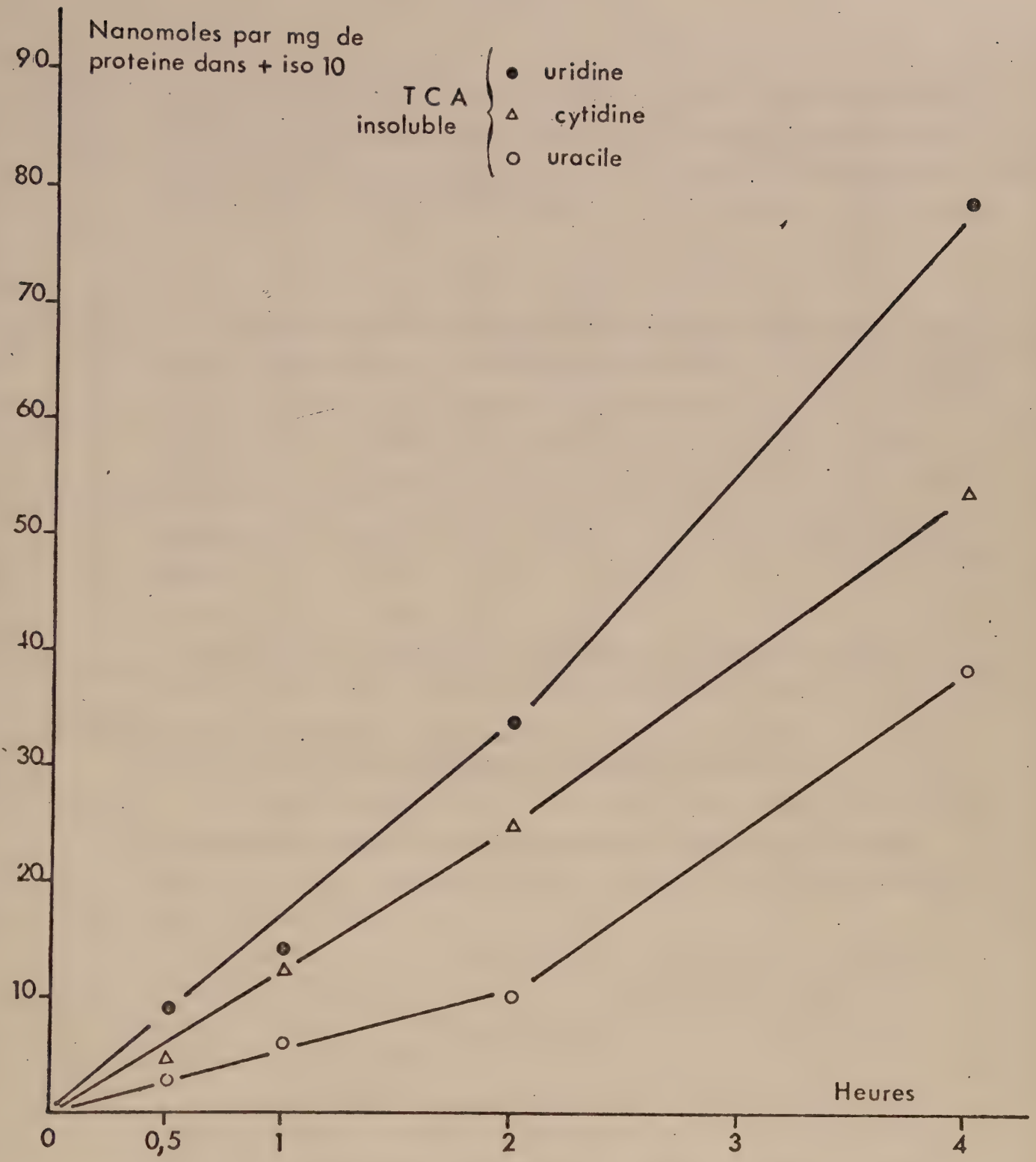


Figure 29 - Incorporation de pyrimidines ^{14}C dans la fraction TCA insoluble de la souche sauvage + iso 10.

Les cultures ont été effectuées en milieu liquide dans les conditions standard.
Les pyrimidines radioactives ont été ajoutées au milieu de culture:
1/2 heure, 1, 2, 3 ou 4 heures avant la récolte du mycélium.

TABLEAU 16

Pyrimidine exogène ^{14}C	Temps de contact	Nanomoles "incorporées" par mg de protéines			
		TCA soluble	TCA insoluble	Total	Rapport $\frac{\text{TCA s}}{\text{TCA in}}$
Uracile	30 mn	9,05	3,075	12,12	2,9
	1 h	14,1	6,35	20,45	2,8
	2 h	17,2	10	27,2	1,7
	4 h	38,35	39,1	77,45	1
Uridine	30 mn	32,25	9,45	41,7	3,4
	1 h	41,05	14,1	55,15	2,9
	2 h	50,35	34,25	84,6	1,5
	4 h	131,15	80,2	211,35	1,6
Cytidine	30 mn	17,35	4,4	21,75	4
	1 h	38	12,75	50,75	3
	2 h	62	25,1	87,1	2,5
	4 h	151,1	54,4	205,5	2,8

"Incorporation" de pyrimidines exogènes dans les fractions TCA soluble et TCA insoluble chez + iso 10(1)

Conditions de culture : milieu liquide, 43 heures.

Nous avons d'abord étudié in vivo le devenir des pyrimidines d'origine externe. Nous avons ensuite recherché in vitro les activités enzymatiques susceptibles de catalyser les différentes étapes du métabolisme de ces pyrimidines.

C - "Pool" de pyrimidines d'origine biosynthétique.

L'analyse quantitative préalable du "pool" de pyrimidines d'une souche sauvage cultivée en milieu minimum liquide (conditions standard) a été menée par des techniques chromatographiques et spectrophotométriques. Sur divers chromatogrammes de la fraction TCA soluble (chapitre I), obtenus en utilisant le solvant de PLESNER, le mélange isopropanol-HCl et un gradient de formiate d'ammonium, nous avons pu déceler la présence d'uracile et d'un nucléotide, vraisemblablement de l'UMP.

L'emploi des pyrimdines radioactives a permis d'étudier de manière quantitative le devenir des pyrimidines exogènes.

D - Devenir des pyrimdines d'origine externe.

La souche sauvage + iso 10 (1) a été cultivée 43 heures en milieu minimum liquide. Les métabolites radioactifs ont été ajoutés dans 4 lots de flacons, 4 heures, 2 heures, 1 heure et 30 minutes avant la récolte du mycélium.

Après la récolte, les extraits bruts ont été fractionnés par l'acide trichloracétique à 10% (voir matériel et méthodes). La radioactivité des fractions en fonction du temps de contact a été mesurée (fig. 28 et 29).

Les résultats (tableau 16), comme ceux obtenus à partir des cultures en milieu solide, correspondent à des vitesses d'incorporation plus élevées pour l'uridine et la cytidine que pour l'uracile. En valeur absolue il pénètre plus de pyrimidines, uracile, uridine ou cytidine dans un mycélium cultivé en milieu liquide que dans un thalle cultivé sur milieu solide. Nous retrouvons ici, "visualisées" par des vitesses d'incorporation de pyrimidines, les différences

TABLEAU 17

Pyrimidine exogène ^{14}C	Temps de Contact	Métabolites formés en %		
		Uracile	Uridine	Nucléotides
Uracile	30 mn	40	27	33
	1 h	40	28	32
	2 h	41	28	31
	4 h	36	29	35
Uridine	30 mn	38	41	21
	1 h	46	32	22
	2 h	32	30	38
	4 h	35	27	38
Cytidine	30 mn	41	24	35
	1 h	41	40	19
	2 h	25	33	37
	4 h	43	22	35

Composition de la fraction TCA soluble chez + iso.10 (1) après "incorporation" d'uracile, d'uridine et de cytidine ^{14}C

- La quantité de chaque métabolite est exprimée en pourcentage de la radioactivité de la fraction TCA soluble.
- Les cultures en milieu minimum liquide ont duré 43 heures.

Le métabolite radioactif a été ajouté 30 minutes, 1 heure, 2 et 4 heures avant la récolte du mycélium. La radioactivité des milieux mesurée avec un compteur Packard Tricarb varie de 85 ipm par nanomole pour le milieu cytidine ^{14}C, 4 heures, à 1168 ipm par nanomole d'uracile pour le milieu uracile ^{14}C 30 minutes.

d'activité métabolique liées aux différents modes de culture dont les conséquences ont été discutées dans le premier chapitre.

$$\text{Le rapport } \frac{\text{radioactivité de la fraction TCA soluble}}{\text{radioactivité de la fraction TCA insoluble}}$$

correspond en première approximation aux quantités respectives de pyrimidines incorporées dans de petites molécules (bases, nucléosides, nucléotides), d'une part, et dans les polynucléotides (ARN, ADN) d'autre part. La proportion d'uracile incorporée dans les macromolécules est élevée par rapport à la totalité de l'uracile absorbé mais en valeur absolue la fraction TCA insoluble formée à partir d'uridine ou de cytidine est plus importante. Cela pourrait être la raison principale de l'efficacité de ces 2 nucléosides comme source de pyrimidine pour les mutants ur^-. Les "pools" formés à partir d'uridine et de cytidine sont plus grands que ceux formés à partir d'uracile en valeur relative et en valeur absolue.

La pénétration des pyrimidines est vraisemblablement sous la dépendance de perméases. En ce qui concerne la vitesse de pénétration peu élevée observée pour l'uracile on peut envisager plusieurs interprétations: la perméase de l'uracile est peu active quelles que soient les conditions d'utilisation de l'uracile pénétré dans la cellule; on peut supposer au contraire que la perméase est rétroinhibée ou réprimée par l'uracile accumulé dans la fraction TCA soluble et donc que le taux de pénétration augmentera si l'uracile est utilisé rapidement.

Des souches ur^- ensemencées directement sur milieu minimum solide + uracile 14 C-2,2.10^{-4}M puis récoltées au bout de 96 heures ont une radioactivité globale supérieure de 25 à 40% à celle des thalles de souche sauvage cultivée dans les mêmes conditions. La pénétration de l'uracile est donc liée à son utilisation.

Dans l'expérience d'incorporation d'uracile, uridine, cytidine par + iso 10 (1) 30 minutes, 1, 2 et 4 heures, la fraction TCA soluble de l'extrait brut a été chromatographiée et les pourcentages de ses divers constituants ont été estimés (tabl. 17).

La somme obtenue en additionnant la radioactivité mesurée dans la tache correspondant à l'emplacement de la cytidine à celle mesurée dans la tache correspondant à l'emplacement de la cytosine ne dépasse pas 1% de la radioactivité de la fraction TCA soluble. Il en est ainsi même lorsque la pyrimidine radioactive ajoutée au milieu de culture est la ^{14}C-cytidine: la cytidine est désaminée après être entrée dans la cellule; il en résulte un apport d'ammonium qui pourrait éventuellement expliquer l'efficacité élevée, un peu supérieure à celle de l'uridine, de la cytidine comme facteur de croissance des souches auxotrophes pour les pyrimidines.

En considérant la composition de la fraction TCA soluble correspondant à chaque pyrimidine pour des temps de contact allant de 30 minutes à 4 heures on ne constate que des fluctuations minimes en fonction du temps de contact. Il semble que dès le temps 30 minutes un équilibre entre les différents constituants de cette fraction soit atteint . De plus, quelle que soit la pyrimidine radioactive fournie dans le milieu, les pourcentages des divers métabolites varient peu. Les interconversions se font donc rapidement entre uracile, uridine, cytidine et nucléotides. Nous avons recherché les activité enzymatiques susceptibles de catalyser ces réactions.

E - Mise en évidence d'enzymes catalysant les transformations entre bases-nucléosides-nucléotides pyrimidiques.

Chez la souche sauvage et chez divers mutants nous avons pu mettre en évidence et doser des enzymes catalysant les transformations entre uracile, uridine et UMP.

1°) - L'uridine-5'-monophosphate pyrophosphorylase: UMPPase (2.4.2.9).

L'activité spécifique de cet enzyme a été mesurée chez la souche sauvage dans les conditions de dosage décrites dans matériel et méthodes. La valeur obtenue en faisant la moyenne de 8 expériences (extrait "séphadexé", conditions standard de culture) est 80 nanomoles ± 20% d'UMP formées par mg de protéines et par heure. Le chlorure de magnésium favorise la réaction :

$$\text{uracile} + \text{PRPP} \xrightarrow[Cl_2Mg]{} \text{UMP} + \text{pyrophosphate}$$

mais à concentration élevée l'inhibe. L'extrait "séphadexé" conserve une partie de son activité à -20°C (25% d'activité en moins au bout de 9 jours). La concentration optimale en Cl_2Mg a été déterminée ainsi que les Km apparents de l'UMPPase pour l'uracile et le PRPP.

L'activité spécifique est du même ordre de grandeur que celle mesurée chez la levure par JUND et LACROUTE (1970): 80 nanomoles d'UMP formées/mg protéines/heure pour un extrait séphadexé de souche sauvage de Coprin, 31, 2 pour un extrait dialysé de la souche diploïde +/+ de Levure.

Action du 6-azauracile.

En présence de 6-azauracile à la concentration de $8{,}8.10^{-4}$M l'activité spécifique apparente de l'UMPPase d'un extrait sauvage se trouve multipliée par 2. Il est toutefois peu vraisemblable qu'il s'agisse d'un phénomène de dérépression car l'activité spécifique de souches ur^- n'est pas augmentée lors d'une culture en présence d'uridine à une concentration limitant la croissance

Tableau 18

	milieu de culture	Activité spécifique *
+ iso 10 (1)	Mm	80
	Mm + 6- azauracile $8.8.10^{-4}$M	160
ur 13.22	Mm + uridine $2.5.10^{-5}$M (limitante)	80
	Mm + uridine 5.10^{-4}M (en excès)	110

Effets du 6-azauracile et de l'uridine du milieu de culture sur l'UMPPase.
* En nanomoles d'UMP formées par mg de protéines et par heure; les cultures ont duré 43 heures en milieu liquide.

Action d'inhibiteurs in vitro.

L'activité de l'UMPPase dans un extrait "séphadexé" de souche sauvage cultivée en milieu minimum liquide a été mesurée, d'une part dans les conditions habituelles de dosage, d'autre part en présence d'inhibiteurs. Les résultats sont consignés dans le tableau 19.

produit ajouté au mélange réactionnel	nanomoles d'UMP formées /mg de protéines/heure	pourcentage d'inhibition
0	90	0
6-azauracile 3.10^{-2}M	30	67
5-fluorouracile 4.10^{-2}M	23	75
UTP $1,26.10^{-3}$M	29	68

Tableau 19

Action in vitro d'inhibiteurs sur l'UMPPase chez + iso 10 (1).

Le 6-azauracile et le 5-fluorouracile, utilisés à des concentrations élevées agissent probablement par compétition avec l'uracile, substrat de la réaction. On sait que ces deux produits peuvent être transformés respectivement en 6-aza UMP ou en 5F-UMP dans la cellule (HEIDELBERGER, 1965 revue). L'action inhibitrice de l'UMP in vitro est en faveur d'une régulation de l'UMPPase in vivo par rétro-inhibition.

Chez la Levure, JUND et LACROUTE (1970) ont isolé des mutants ura-5 bloqués pour l'OMPPase mais bradytrophes. Ces mutants ne peuvent plus croître sur milieu minimum si leur génome comporte une seconde mutation bloquant l'UMPPase. La bradytrophie des mutants OMPPase$^-$ est interprétée comme la conséquence d'une faible activité OMPPase de l'UMPPase. Chez le Coprin les souches mutées au locus ur 7 sont dépourvues d'activité OMPPase et incapables de croître sur milieu

TABLEAU 20

Souche	Milieu de culture	
ur 13.22	Mm + uridine $2,5.10^{-5}$M	Mm + uridine 5.10^{-4}M
ATCase	2200	1100
OMPPase	1024	480
UMPPase	53	62
Uridine kinase	108	365
OTCase	5020	4900

TABLEAU 21

Souche	Milieu de culture			
+iso 10	Mm	Mm+ uracile 4.10^{-3}M	Mm+ uridine 2.10^{-3}M	Mm+ cytidine 2.10^{-3}M
ATCase	1570	1500	1660	1600
DHOase	3540	3620	3850	3500
uridine kinase	250	730	880	1030

Effet des pyrimidines exogènes sur l'uridine kinase chez ur 13 et + iso 10.

Les cultures ont été faites dans les conditions standard. Les activités spécifiques sont exprimées en nanomoles par mg de protéines et par heure.

minimum. Chez Neurospora (CAROLINE, 1969) des mutants pyr 2 dépourvus d'activité OMPPase ont été isolés; il n'est pas fait mention de bradytrophie. Chez le Coprin, et vraisemblablement chez Neurospora, l'UMPPase parait dépourvue d'activité OMPPase; si cette activité existe elle est en tout cas insuffisante pour permettre la croissance des souches OMPPase$^-$ de Coprin sur milieu minimum.

2°) - Uridine kinase (2.7.1.48).

Cet enzyme a été mis en évidence chez la souche sauvage de Coprin en utilisant l'uridine ^{14}C comme substrat de la réaction uridine + ATP $\longrightarrow$ UMP + ADP. Les activités spécifiques mesurées dans 8 expériences ont permis d'établir le chiffre moyen de 240 nanomoles d'UMP formées par mg de protéines et par heure pour un extrait de souche sauvage + iso 10 (1) cultivée en milieu minimum liquide (valeurs extrêmes 180 et 265). Chez la Levure l'activité spécifique mesurée chez la souche sauvage diploïde +/+ est 522 nanomoles d'UMP par mg de protéines et par heure (JUND et LACROUTE, 1970).

L'activité spécifique de l'uridine kinase est très augmentée chez la souche ur 13 en présence d'uridine dans le milieu de culture (tableau 20). Il est possible que l'uridine, substrat de la réaction, induise la synthèse de l'uridine kinase. Chez la souche sauvage l'augmentation d'activité spécifique de l'uridine kinase a été constatée en présence d'uracile dans le milieu de culture, mais elle est plus élevée en présence d'uridine ou de cytidine (tableau 21).

L'uridine kinase de la souche + iso 10 (1) est insensible in vitro à l'action de nucléotides ou d'un analogue le 5-fluoro-uracile ajoutée dans le mélange réactionnel: aux concentrations utilisées, l'UTP 10^{-2}M, le CTP 10^{-2}M, UTP 10^{-2}M + CTP 10^{-2}M, le 5-fluorouracile $4,10^{-2}$M, ne modifient pas l'activité de l'uridine kinase. Le fait de n'observer aucune inhibition in vitro peut être dû à l'altération du site régulateur en cours d'extraction ou encore à un excès de substrats ou de Cl_2Mg dans le mélange réactionnel (ANDERSON et BROCKMAN, 1964); il n'implique pas obligatoirement que l'uridine

kinase in vivo soit insensible à la régulation par rétroinhibition.

La transformation de l'UMP en uridine a été mise en évidence in vitro. A partir d'un mélange réactionnel comportant 530 nanomoles d'UMP ^{14}C et 30 nanomoles de tampon Tris pH 7,5 avec des concentrations 0,36 et 0,54mg extrait "séphadexé" de souche + iso 10 (1) pour un volume final de 0,3ml, nous avons observé la formation de 500 nanomoles d'uridine par mg de protéines et par heure. La quantité d'uracile obtenue étant de quelques nanomoles, cet essai montre une transformation préférentielle de l'UMP en uridine in vitro. Il est possible que cette réaction intervienne in vivo dans le "recyclage" des nucléotides provenant de la dégradation des acides nucléiques.

3°) Uridine ribohydrolase (3.2.2.3).

La réaction catalysée est:

$$\text{uridine} + H_2O \longrightarrow \text{uracile} + \text{D. ribose}$$

L'activité spécifique d'un extrait de souche sauvage cultivée sur milieu minimum a été mesurée: 64 nanomoles d'uracile formées par mg de protéines et par heure (chez la Levure la souche +/+ a une activité spécifique nettement plus élevée 600 nanomoles d'uracile formées par mg de protéines et par heure). La nature de l'enzyme transformant l'uridine ^{14}C en uracile ^{14}C dans les expérienees in vitro peut être discutée. Avec la technique de dosage employée (le seul produit de la réaction mesuré est l'uracile ^{14}C; matériel et méthodes) un autre enzyme peut transformer l'uridine en uracile: l'uridine phosphorylase qui catalyse la réaction uridine + Pi $\longrightarrow$ uracile + D. ribose-1-Phosphate. Toutefois nous avons constaté que l'adjonction de tampon phosphate dans le mélange réactionnel ne favorise pas la réaction. Il est donc raisonnable de penser que les dosages effectués concernent l'uridine ribohydrolase et non l'uridine phosphorylase.

Une preuve supplémentaire pourrait être fournie en mettant en évidence par chromatographie la formation de D-ribose et non de D-ribose-1-phosphate.

Selon les résultats du tableau 20 la présence d'uridine dans le milieu de culture a peu d'influence sur le niveau d'uridine ribohydrolase.

4°) Cytidine désaminase (3.5.4.5) : Cytidine + H_2O ⟶ uridine + NH_3.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence in vitro d'activité cytidine désaminase chez le Coprin. Toutefois les résultats de l'analyse des fractions TCA solubles de souche sauvage ayant incorporé de la cytidine sont en faveur de l'existence de cette activité. Une autre preuve, indirecte, de la désamination de la cytidine a été obtenue: sur milieu minimum dépourvu de sulfate d'ammonium la souche sauvage croît lentement, avec un aspect grêle caractéristique de la carence en azote; en supplémentant cette souche avec de la cytidine d'une part avec de l'uridine d'autre part on constate une amélioration très nette de la croissance de la souche sauvage en présence de cytidine 10^{-2}M tandis que l'amélioration apportée par l'uridine est faible.

Après avoir mis en évidence des activités enzymatiques susceptibles de catalyser les étapes du métabolisme des pyrimidines d'origine externe nous avons entrepris de mettre en évidenee des transformations intervenant dans la cellule immédiatement après la pénétration de pyrimidines exogènes.

F - Incorporation d'uracile, d'uridine et de cytidine ^{14}C dans la souche + iso 10 (1) durant des temps très courts.

Après des temps de contact de 30 secondes, 1 minute, 2 minutes, avec le métabolite radioactif en milieu liquide, les mycéliums ont été lavés avec du tampon phosphate M/4 à 4°C et congelés à -80°C le plus rapidement possible. L'extrait brut a été séparé en fractions TCA soluble et insoluble. La radioactivité globale de chacune des deux fractions a été évaluée (tableau 21). la fraction TCA soluble a été chromatographiée: (1) solvant de PLESNER 2) isopropanol-HCl

TABLEAU 22

Pyrimidine exogène ^{14}C	Temps de contact mn	nanomoles "incorporées par mg de protéines		
		TCA soluble	TCA insoluble	Total
Uracile	0,5	6	0,15	6,15
	1	4,4	0,14	4,54
	2	5,65	0,23	5,88
Uridine	0,5	3,64	0,06	3,70
	1	4,55	0,22	4,77
	2	9,25	0,18	9,43
Cytidine	0,5	2,62	0,05	2,67
	1	5	0,07	5,07
	2	5,7	0,09	5,79

"Incorporation" d'uracile, d'uridine et de cytidine ^{14}C dans les fractions TCA soluble et TCA insoluble de la souche + iso 10 (1) après des temps de contact de 30 secondes à 2 minutes avec le produit radioactif.

Les pyrimidines marquées à la concentration $2.10^{-14}M$ ont été ajoutées au bout de 43 heures dans les cultures en milieu minimum liquide (conditions standard).

Radioactivité des milieux en ipm par nanomole.

uracile 30" : 2404 1' : 1965 2' : 863

cytidine 30" : 9731 1' : 6834 2' : 2992

Tableau 22 bis

Pyrimidine exogène ^{14}C	Temps de Contact	Métabolites formés en %				
		Uracile	Uridine	nucléotides	Cytosine	Cytidine
Uracile	0,5mn	97,2	1,5	1,3		
	1 mn	96	1,7	2,3		
	2 mn	92	5,8	2,2		
Uridine	0,5mn	60	25	15		
	1 mn	63	23	14		
	2 mn	48	35	17		
Cytidine	0,5mn	44,5	33	8	5,3	9,2
	1 mn	44,6	37,7	7	1	9,7
	2 mn	49,3	34	4	3,3	9,4

Composition de la fraction TCA soluble chez + iso 10 (1) après "incorporation" d'uracile, d'uridine et de cytidine ^{14}C pendant des temps courts.

Les cultures en milieu liquide ont duré 43 heures (conditions standard). Les quantités de métabolites formés sont exprimées en pourcentage de la radioactivité de la fraction TCA soluble.

(matériel et méthodes) en présence d'un mélange témoin de pyrimidines. La présence de radioactivité en quantité mesurable a été mise en évidence dans les taches de nucléotides, d'uracile, d'uridine, de cytosine et de cytidine (tableau 22 et 22bis).

L'uridine est transformée pour une grande partie en uracile. Ce résultat semble indiquer l'existence de deux voies possibles pour la transformation de l'uridine en UMP: une voie directe: uridine + ATP → UMP + ADP, catalysée par l'uridine kinase, une voie en deux étapes uridine → uracile puis uracile + PRPP → UMP + PP faisant intervenir successivement l'uridine ribohydrolase ou l'uridine phosphorylase, puis l'UMPPase.

La cytidine est rapidement désaminée en uridine qui suit alors vraisemblablement les voies indiquées ci-dessus vers l'UMP.

L'uracile paraît être transformé en UMP directement.

II - UTILISATION D'ANALOGUES DE PYRIMIDINES.

L'étude physiologique et génétique de la résistance aux analogues de pyrimidines a été menée chez divers organismes dans le but d'analyser les différents aspects du métabolisme des pyrimidines.

Chez le Coprin nous avons utilisé les 5-fluoropyrimidines en vue de sélectionner des mutants modifiés dans la régulation de la biosynthèse de l'UMP. Quelques aspects génétiques et physiologiques du métabolisme des pyrimidines exogènes ont été étudiés chez les souches résistantes aux 5-fluoropyrimidines.

A - Action inhibitrice des analogues de pyrimdines.

Plusieurs auteurs ont cherché à déterminer les mécanismes responsables de l'inhibition de croissance par les 5-fluoropyrimidines. Chez Staphylococcus aureus HIGNETT (1966) a observé en présence de 5-fluorouracile, l'apparition de particules ribosomales ayant des coefficients de sédimentation anormaux. Chez Escherichia coli, le 5-fluorouracile empêche la formation de particules normales 50 S (SELLS et CRUDUP, 1966).

Inhibiteurs	% d'inhibition	iso 10	r 17	FUR C r17	FUR 0.1	FUR 8.4	FUR 10	FUR 11.2	FUR 282	FUR 31	FUI 4	arg6.sul6
5-Fluorouracile	50	3.10^{-8}	3.10^{-8}	$\geqslant 4.10^{-6}$	7.10^{-6}	4.10^{-6}	3.10^{-6}	4.10^{-7}	1.10^{-7}	5.10^{-8}	1.10^{-7}	$\leqslant 1.10^{-6}$
	100	8.10^{-8}	$\geqslant 1.10^{-7}$		1.10^{-4}	8.10^{-6}	$\geqslant 4.10^{-6}$	2.10^{-6}	8.10^{-6}	4.10^{-7}	2.10^{-7}	$> 4.10^{-6}$
5-Fluorouridine	50	5.10^{-8}	2.10^{-8}	1.10^{-7}	1.10^{-6}	2.10^{-6}	$\leqslant 1.10^{-6}$	$< 1.10^{-7}$	$2,5.10^{-7}$	$< 1.10^{-7}$	3.10^{-7}	$\leqslant 1.10^{-7}$
	100	$< 1.10^{-7}$	$\geqslant 5.10^{-8}$	4.10^{-6}	4.10^{-6}	4.10^{-6}	$\geqslant 2.10^{-6}$	5.10^{-7}	1.10^{-6}	$2,5.10^{-7}$	$\geqslant 4.10^{-6}$	2.10^{-6}
5-Fluorocytidine	50	$1,5.10^{-8}$	4.10^{-8}	5.10^{-7}	4.10^{-7}	5.10^{-7}	$\geqslant 2.10^{-7}$	$\leqslant 1.10^{-7}$	$2,5.10^{-7}$	$< 1.10^{-7}$	1.10^{-7}	5.10^{-8}
	100	$\leqslant 1.10^{-7}$	$\geqslant 5.10^{-8}$	$\geqslant 2.10^{-6}$	2.10^{-6}	$> 2.10^{-6}$	2.10^{-6}	$2,5.10^{-7}$	2.10^{-6}	$\leqslant 2.10^{-6}$	$\geqslant 2.10^{-6}$	$\geqslant 2.10^{-6}$
5-Fluorocytosine	0	5.10^{-6}	5.10^{-6}	5.10^{-6}	5.10^{-6}	5.10^{-6}	5.10^{-6}	5.10^{-6}	5.10^{-6}	5.10^{-6}	5.10^{-6}	5.10^{-6}

TABLEAU 23 Niveaux de résistance de différentes souches de Coprin aux 5-Fluoropyrimidines.

Les concentrations des inhibiteurs dans le milieu de culture sont exprimées en molarité.

Le pourcentage d'inhibition est évaluée par comparaison entre le diamètre de thalles âgés de 6 jours cultivés, les uns sur milieu minimum, les autres sur milieu minimum additionné de 5-Fluoropyrimidine.

Remarque : dans le tableau 23 chaque locus est représenté par la souche présentant le niveau de résistance le plus élevé.

La plupart des faits concernant l'action inhibitrice des 5-fluoropyrimidines peuvent être expliqués par le mécanisme proposé par HEIDELBERGER (1965): les 5-fluoropyrimidines après transformation en 5-F UMP sont incorporées dans les ARN messagers; par ailleurs les poly-5 FU de synthèse se comportent *in vitro* exactement comme les poly-U et ne sauraient donc causer d'erreurs de traduction. Selon HEIDELBERGER le 5-fluorouracile pourrait former des appariements incorrects avec l'ADN au moment de la transcription; les ARN messagers anormaux synthétisés conduiraient à la synthèse des protéines anormales. Les perturbations du métabolisme cellulaire qui en résultent sont caractérisées expérimentalement par l'inhibition de synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines.

Le 5-fluorouracile non incorporé dans des ARN agit par blocage de la thymidylate synthétase des bactéries (HEIDELBERGER, revue, 1965) empêchant ainsi la réplication de l'ADN faute de thymine.

B - Inhibition de croissance par les 5-fluoropyrimidines chez + iso 10.

La croissance de la souche sauvage + iso 10 est complètement inhibée par la présence de 5-fluorouracile, 5-fluorouridine ou 5-fluorocytidine à la concentration 10^{-7}M. Ainsi qu'on pouvait le prévoir puisque les pyrimidines fluorées sont métabolisées par les mêmes voies que les pyrimidines naturelles, la 5-fluorocytosine à la concentration 10^{-3}M n'est pas inhibitrice car la cytosine ne constitue une source de pyrimidines utilisable par la Coprin (tableau 23).

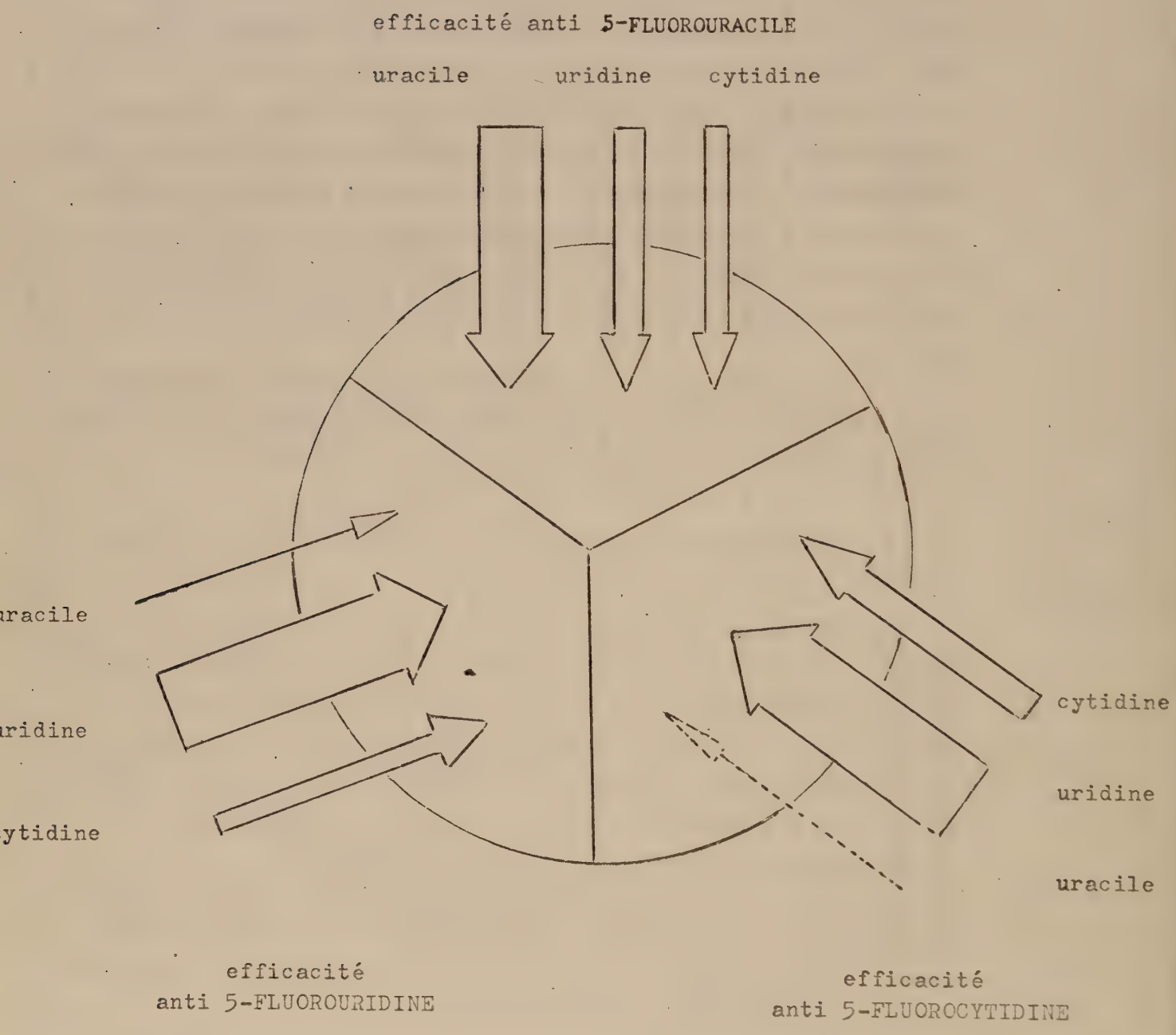
La sensibilité de la souche sauvage à un autre analogue, le 6-azauracile, a été examinée: la concentration 6.10^{-3}M d'azauracile inhibe à 100% la souche + iso 10. Le mode d'action de cet inhibiteur a été décrit précédemment (chapitre II).

C - Levée de l'inhibition due aux 5-fluoropyrimidines.

Nous nous sommes d'abord assurés de la spécificité de l'antagonisme entre pyrimidines naturelles et 5-fluoropyrimidines afin de justifier l'utilisation de ces analogues pour la recherche de mutants modifiés dans le métabolisme des pyrimidines (régulation de la biosynthèse de l'UMP ou utilisation des pyrimidines exogènes); nous avons vérifié qu'en ajoutant dans le milieu de culture contenant une

Figure 30

Antagonisme entre pyrimidines et 5-fluoropyrimidines
chez la souche sauvage + iso 10



L'épaisseur de la fleche est proportionnelle
à l'efficacité de la pyrimidine comme antagoniste de
la 5-fluoropyrimidine

Tableau 24

Action antagoniste des pyrimidines contre l'inhibition de croissance causée par les 5-fluoro-pyrimidines chez + iso 10 et r 17.

antagoniste		5-fluorouracile 4.10^{-6}M		5-fluorouridine 2.10^{-6}M		5-fluorocytidine 2.10^{-6}M	
uracile		+ iso 10	r 17	+ iso 10	r 17	+ iso 10	r 17
	concentration	8.10^{-4}M	8.10^{-4}M	8.10^{-4}M	1.10^{-4}M	8.10^{-4}M	8.10^{-4}M
	Levée d'inhibition en %	100	75	2	14	0	20
uridine							
	concentration	4.10^{-4}M	4.10^{-4}M	$2,5.10^{-4}$M	8.10^{-4}M	$2,5.10^{-4}$M	4.10^{-4}M
	Levée d'inhibition en %	25	20	100	80	100	100
cytidine							
	concentration	4.10^{-4}M	4.10^{-4}M	8.10^{-4}M	8.10^{-4}M	8.10^{-4}M	8.10^{-4}M
	Levée d'inhibition en %	20	20	50	47	100	100
cytosine							
	concentration	8.10^{-4}M	8.10^{-4}M	$1,6.10^{-3}$M	$1,6.10^{-3}$M	$1,6.10^{-3}$M	$1,6.10^{-3}$M
	Levée d'inhibition en %	0	0	0	0	0	0
acide orotique							
	concentration	$1,6.10^{-4}$M	2.10^{-4}M	$3,2.10^{-3}$M	4.10^{-4}M	$3,2.10^{-3}$M	4.10^{-4}M
	Levée d'inhibition en %	0	25	0	25	0	30

La levée d'inhibition est évaluée en comparant les diamètres de thalles âgés de 6 jours sur milieu minimum d'une part, et sur milieu minimum contenant l'inhibiteur et l'antagoniste aux concentrations indiquées d'autre part.

5-fluoropyrimidine de l'uracile, de l'uridine ou de la cytidine la croissance de la souche sauvage est rétablie (le tableau 24 regroupe des résultats concernant la souche sauvage et la souche r 17, utilisatrice de l'acide orotique). La cytosine 8.10^{-4}M, l'acide orotique $1,6.10^{-3}$M (sauf chez la souche r 17), l'arginine 3.10^{-4}M, l'adénine 2.10^{-4}M n'ont aucun effet antagoniste.

Les différentes pyrimidines antagonistes n'ont pas toutes, la même efficacité "anti-5-fluoropyrimidine". Contre le 5-fluorouracile, l'uracile est plus efficace que l'uridine et la cytidine. Contre la 5-fluororidine l'uridine est un bon antagoniste, la cytidine est un peu moins efficace et l'uracile l'est encore beaucoup moins. Contre la 5-fluorocytidine, il est surprenant de constater que l'uridine possède un pouvoir antagonsite supérieur à celui de la cytidine, l'uracile étant, comme pour la 5-fluorouridine, un antagoniste médiocre.

Les observations concernant l'efficacité des divers antagonistes peuvent être interprétées à partir des conclusions tirées des expériences "d'incorporation". L'uridine et la cytidine peuvent jouer le rôle d'antagonistes du 5-fluorouracile parcequ'elles sont partiellement transformées en uracile après leur pénétration dans la cellule. L'uracile est un antagoniste médiocre des 5-fluoronucléosides car au cours de sa transformation en UMP il se forme peu d'uridine; de plus, nous avons vu qu'il pénétrait relativement lentement dans la cellule. Pour interpréter l'efficacité de l'uridine contre la 5-fluorocytidine il est raisonnable de penser que cet inhibiteur est rapidement transformé en 5-fluorouridine; la cytidine pénétrant moins rapidement que l'uridine dans la cellule, il en résulte une efficacité inférieure contre la 5-fluorocytidine.

Un schéma correspondant aux résultats du tableau 24, 1ère colonne, symbolise l'efficacité anti-5-fluoropyrimidine de l'uracile, de l'uridine et de la cytidine (fig. 30).

III - ETUDE GENETIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DES MUTANTS RESISTANTS AUX 5-FLUOROPYRIMIDINES.

A - Mutagénèse et sélection. Classification des mutants.

Les agents mutagènes employés sont les rayons U.V et la nitro-

soguanidine. Le traitement mutagène a été appliqué à la souche sauvage: thalles iso 10 (1) ou spores provenant de la fructification du dicaryote + iso 10 (1)/+ iso 10 (4).

Des mutants résistants aux 5-fluoropyrimidines ont été obtenus par sélection sur milieu minimum gélosé additionné de 5-fluorouracile 8.10^{-8}M. Le croisement de chacun des mutants par la souche sauvage a permis de montrer le caractère monogénique du déterminisme de la résistance (LE HEGARAT et PREVOST, 1965).

L'analyse génétique des croisements entre mutants obtenus indépendamment permet le classement des souches résistantes en 6 groupes d'allèles. Sur 55 souches mutées sélectionnées en présence de 5-fluorouracile à la suite d'une des expériences de mutagénèse on a trouvé 43 FUR 0,6 FUR 8,1 FUR 10, 2 FUR 11, 2 FUR 28 (1 FUR 31*).

Plusieurs mutagénèses par les U.V. ou la nitrosoguanidine ont été effectuées en sélectionnant les souches résistantes sur milieu minimum additionné de 5-fluorouridine 10^{-6}M. Les mutants obtenus ont tous été classés par test fonctionnel d'allèlisme dans les groupes FUR 0 ou FUR 8 en nombre équivalent. En diminuant la concentration de la 5-fluorouridine à 3.10^{-7}M nous avons pu sélectionner une souche plus spécifiquement résistante à la 5- fluorouridine. Cette souche a été confrontée avec des mutants de tous les groupes FUR. La détermination fonctionnelle de l'allèlisme chez les dicaryotes obtenus montre que la souche FUI 4 n'appartient à aucun des six groupes d'allèles FUR.

* L'étude du mutant FUR 31 n'a pas été poursuivie en raison du faible taux de croissance de la souche et sa mauvaise capacité à former des dicaryotes et des carpophores.

TABLEAU 25

	FUR 8	FUR 10	FUR 11	FUR 28
FUR 0	10-8:9 27 (95 %) 47	14 R 145 spores 10	3-2:4 9 (80 %) 46	28-21:45 94 (80 %) 46
FUR 8		7-4:4 15 (91 %) 40	20-11:7 38 (81 %) 38	16-13:26 55 (85 %) 47

LOCALISATION GENETIQUE DES MUTATIONS FUR

Pour chaque croisement ont été figurés :

1) le rapport : $\frac{\text{nombre de tétrades (ditypes parentales-ditypes recombinés : tétratype}}{\text{nombre de tétrades analysées}}$

R : signifie spore recombinée

2) entre parenthèses : le pourcentage de germination

3) souligné : le pourcentage de spores recombinées

TABLEAU 26

	ur 1	ur 19	ur 4	ur 7	ur 13	arg 6su16	A	B	col 1	ad 9	arg 3
FUR 0	4-11:14 29 (52%) 62	23-0:19 42 (40%) 23	9-8:12 29 (55%) 48	4-15:14 33 (53%) 66	18-0:26 44 (60%) 30						
FUR 8		14-2:4 20 (33%) 20	5-13:5 23 (22%) 67	16-20:20 56 (72%) 54		7-3:8 18 (70 %) 39			8 R 130 spores (81 %) 6	7 R 50 spores (30 %) 14	4 R 36 spores (45 %) 11
FUR 28			11-10:14 35 (79%) 49	4-3:10 17 (82%) 47			9 R 52 spores (80%) 17				
FUR 11	8-12:14 44 (70%) 43	14-11:4 29 (93%) 45						4 18 spores 22			
FUR 10					30 R 120 spores (90 %) 25						

LOCALISATION GENETIQUE DES MUTATIONS FUR

B - Localisation des gènes de résistance aux 5-fluoropyrimidines.

L'analyse des résultats des croisements des mutants résistants

- entre eux (tableau 25)
- par différentes souches comportant des gènes mutés proches des centromères et
- par les souches ur$^-$ (tableau 26).

permet de localiser un certain nombre de ces mutants sur la carte chromosomique du Coprin (fig. 22)* . Aucune des mutations conférant la résistance aux 5-fluoropyrimidines n'a été située dans un locus ur$^-$ ce qui réduit à néant toute possibilité que les mutants obtenus soient affectés pour la rétroinhibition d'un enzyme de la chaîne de biosynthèse de l'UMP par la voie de l'acide orotique.

C -Les niveaux de résistance des souches FUR et FUI

Le caractère de dominance ou de récessivité des gènes FUR et FUI a été examiné chez des dicaryotes (FUR ou FUI x iso 10). Ils sont tous semi dominants à l'exception de FUR 0 qui est légèrement dominant.

D'après les résultats du tableau 23 on peut classer les souches mutantes en trois catégories:

La première catégorie comprend des souches ayant un niveau de résistance élévé à chacun des 3 analogues: loci FUR 0, FUR 8, FUR 10.

La deuxième catégorie comporte des souches plus spécifiquement résistantes à la 5-fluorouridine et à la 5-fluorocytidine: loci FUI4, FUR 28.

Le locus FUR 11 correspond à une troisième catégorie, peu résistante mais plus spécifiquement au 5-fluorouracile.

Chez l'ensemble des mutants, on remarque l'identité des niveaux de résistance à la 5-fluorouridine et à la 5-fluorocytidine.

* Les mutations aux loci FUR 8 et surtout FUR 11 constituent des marqueurs très utiles pour des études génétiques en raison de leur proximité des centromères des chromosomes I (FUR 11) et II (FUR 8).

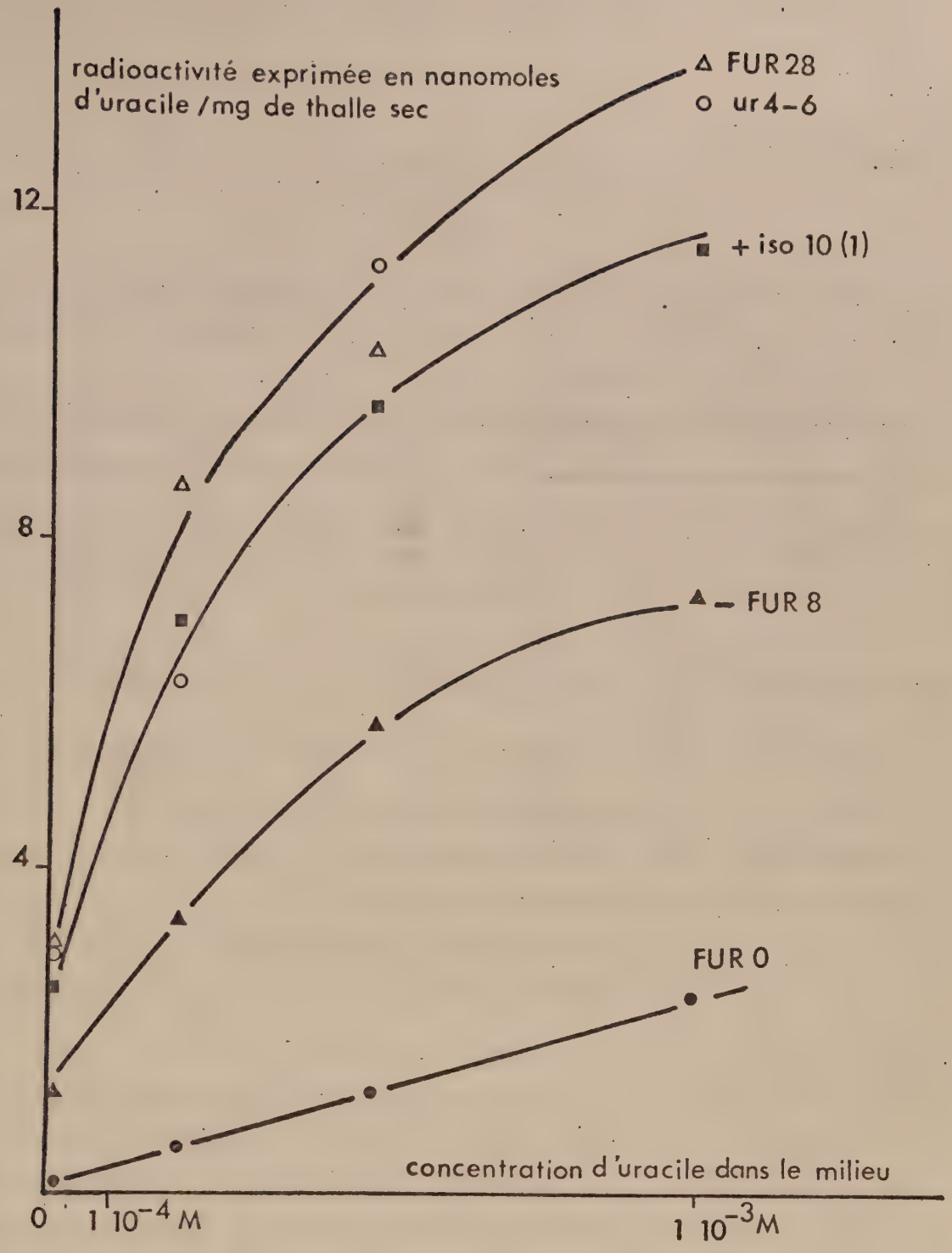


Figure 30 bis - Fixation d'uracile par différents mutants de Coprinus radiatus en fonction de la concentration en uracile.

Les thalles ont été cultivés 4 jours sur milieu minimum gélosé + uracile ^{14}C.

TABLEAU 27

Souches		Uracile	Uridine	Cytidine
n° de collection	génotype			
2001	+ iso 10(1)	100 *	100 *	100 *
1000	FUR 0.1 (1)	23	40	36
1021	FUR 8.4 (1)	64	76	67
1107	FUR 10 (1)	48	59	39
1037	FUR 11.2 (1)	66	117	120
1059	FUR 28.2	115	74	76
	FUI 4 (1)	47	28	32
2013	arg6 su.16(1)	67	86	70

"Incorporation" de pyrimidines ^{14}C chez les souches résistantes aux 5-fluoropyrimidines

Les souches ont été cultivées sur milieu minimum gélosé pendant 4 jours puis tranférées sur les milieux contenant les pyrimidines radioactives à la concentration 2.10^{-4} M. Les thalles ont été maintenus une heure en contact avec les milieux radioactif. La radioactivité fixée par les mycéliums est exprimée en pourcentage de celle de la souche sauvage + iso.10.* Dans les conditions de l'expérience les valeurs réelles pour la souche sauvage sont en nanomoles des pyrimidines ^{14}C/mg de protéines.

uracile : 1,9 ; uridine : 3,2

cytidine : 2,2 ; cytosine : 1,2

acide orotique : 4,4

D - Incorporation de pyrimidines par les souches FUR et FUI.

Toutes les souches FUR et FUI étudiées incorporent les pyrimidines plus lentement que la souche sauvage (tableau 27).

Leurs niveaux de résistance et leurs taux d'incorporation de pyrimidines permettent de classer les mutants en deux catégories; la première comporte les souches très résistantes et incorporent peu les pyrimidines: souches FUR 0, FUR 8, FUR 10, FUI 4; la deuxième comporte des souches peu résistantes et peu modifiées dans leur taux d'incorporation par rapport à la souche sauvage: souches FUR 11, FUR 28 et arg 6. su 16 (fig. 30bis).

E - Etude des différents loci de résistance aux 5-fluoropyrimidines.

Locus FUR 0

Ce locus est situé sur le chromosome VIII

Les mutants FUR 0 sont les plus résistants au 5-fluorouracile et au 6-azauracile parmi tous les mutants FUR et FUI. La souche FUR 0.1 (1) a été particulièrement étudiée.

Les mutants FUR 0 excrètent de l'uracile dans le milieu de culture. Ce produit a été caractérisé chez FUR 0.1 au moyen de trois tests, chromatographique, spectrophotométrique et biologique (chapitre I). La comparaison des diamètres des thalles ur^- ensemencés sur le milieu d'excrétion et sur des milieux présentant une gamme de concentrations d'uracile permet d'évaluer la quantité d'uracile excrétée par la souche FUR 0.1: 250 nanomoles d'uracile par mg de protéines en 40 heures.

La souche FUR 0.1, ur 4.6, r 17 après avoir été cultivée sur milieu minimum + acide orotique ^{14}C à la concentration $8.10^{-4}M$ excrète un mélange comprenant 2/3 d'uridine ^{14}C pour 1/3 d'uracile ^{14}C. L'excrétion de quantités importantes d'uracile par les souches FUR 0 ne peut que favoriser leur résistance au 5-fluorouracile en

TABLEAU 28

Souches	UMPPase	uridine kinase	uridine ribohydrolase
+ iso.10 (1)	80	240	64
FUR 0.1 (1)	70	66	41
FUR 8.4 (1)	103	147	99
FUR 10	66	182	37
FUR 11.2	80	50	135
FUR 28.2	130	262	158
FUI 4	114	91	276
FUR 0.1 FUR 8.4	60	44	60
arg6.su 16 (1)	80	150	180

Activités spécifiques des enzymes d'inconversion chez les mutants résistants aux 5-fluoropyrimidines

Les activités spécifiques sont exprimées en nanomoles de substrat transformé par mg de protéines et par heure
Cultures : conditions standard.

diluant cet analogue au voisinage des thalles et donc en diminuant les quantités de 5-fluorouracile susceptibles de pénétrer dans le mycélium.

Les niveaux des enzymes de biosynthèse chez la souche FUR 0.1 cultivée sur milieu minimum sont peu modifiés par rapport à ceux de la souche sauvage; l'ATCase, la DHOase ont des activités spécifiques égales à 70% de celles de la souche sauvage cultivée en milieu minimum; l'OMPPase a un niveau identique à celui de la souche sauvage. Il peut s'agir d'une répression de l'ATCase par un excès de pyrimidines, celui-ci étant également responsable de l'excrétion d'uracile.

Parmi les enzymes qui catalysent les interconversions entre l'uracile, l'uridine et l'UMP, l'UMPPase et l'uridine ribohydrolase ont un niveau équivalent à celui de la souche sauvage. L'activité spécifique de l'uridine kinase chez FUR 0.1 ne dépasse pas 1/3 de celle de la souche sauvage (tabl. 28). Plusieurs interprétations de ce bloc partiel de l'uridine kinase sont possibles. Une mutation dans le gène de structure réduisant l'activité catalytique de l'enzyme peut être envisagée mais d'autres souches FUR possèdent des activités spécifiques uridine kinase très basses; ces souches sont mutées dans des loci différents. Une autre hypothèse, plus plausible est l'intervention de plusieurs gènes gouvernant l'uridine kinase ou l'existence de plusieurs enzymes à activité uridine kinase, codé s par des gènes différents; la mutation de l'un quelconque de ces gènes peut entraîner une diminution de l'activité spécifique de l'uridine.

Une catégorie de mutants sélectionnés chez la Levure pour leur résistance au 5-fluorouracile présente beaucoup d'analogie avec les mutants FUR 0 du Coprin. En effet les mutants ups type 2 obtenus par GRENSON (1969), comme les souches FUR 1.1 de LACROUTE (1966) (appartenant au même groupe d'allèles que les ups) sont résistants au 5-fluorouracile et à la 5-fluorouridine; les pyrimidines correspondantes sont peu incorporées; le croisement entre ces souches et des souches ur^- fournit des doubles mutants incapables de croître

sur uracile et ne pouvant croître que lentement sur uridine; tous excrètent de grandes quantités d'uracile. Les mutants ups ont une activité uridine kinase très basse comparativement à celle de la souche sauvage. Au même locus, LACROUTE (1966) a obtenu des mutations conduisant à la perte de l'UMPPase.

L'interprétation proposée par GRENSON est la suivante: la synthèse de l'uridine kinase est contrôlée par deux gènes non liés dont l'un est très voisin du gène ups qui contrôle l'activité UMPPase, le niveau peu élevé de l'activité kinase chez les mutants ups est imputable à des effets polaires de mutations dans le gène ups. Les mutants FUR 0 du Coprin pourraient être équivalents aux mutants ups de Levure. Il faut toutefois indiquer que nous ne possèdons aucun mutant UMPPase$^-$ dans cette catégorie. Les mutants FUR 0 du Coprin forment une classe homogène quant à leur taux d'incorporation de pyrimidines et quant à leur résistance (tableau 29) contrairement aux ups ou au FUR 1 de Levure.

La comparaison entre incorporation d'uracile, d'uridine et de cytidine ^{14}C chez les différentes souches FUR 0 (tableau 29) ne permet pas de distinguer plusieurs classes de mutants au locus FUR 0. Tous les mutants du groupe FUR 0 sont semi dominants en ce qui concerne l'incorporation d'uracile ^{14}C (l'incorporation des dicaryotes (FUR 0) x (+) est la moyenne arithmétique de l'incorporation des dicaryotes (+) x (+) et (FUR 0) x (FUR 0).

Tableau 29

Incorporation des pyrimdines ^{14}C chez différents mutants FUR 0

Souches	Uracile	Uridine	Cytidine
1 000 = FUR 0.1(1)	23	40	36
1 009	26	46	37
1 010	19	35	49
1 015	18	37	29
1 004	32	55	48

Les conditions expérimentales sont identiques à celles du tableau 27. La radioactivité fixée par les mycéliums est exprimée en pourcentage de celle de la souche sauvage.

Souches	Mm	Mm + uracile 10^{-4}M	Mm + uridine 10^{-4}M	Mm + cytidine 10^{-4}M	Mm + acide orotique 2.10^{-4}M
ur 4	0	12	20	25	0
ur 19	0	15	11	9	0
ur 7	0	9	12	13	0
ur 13	0	18	27	28	0
ur 4 r 17	0	13	20	25	20
ur 1a.16 FUR 11	0	10 (----)	20	21	-
ur 1b.33 FUR 11	0	12 (----)	20	19	-
ur 19 FUR 11	0	7 (====)	12	12	-
ur 4.6 FUR 11	0	7 (----)	15	14	-

Souches	Mm	Mm + uracile 10^{-3}M	Mm + uridine 10^{-3}M	Mm cytidine 10^{-3}M	Mm + acide orotique 10^{-3}M
ur 4.6 FUR 8	0	5	7	10	0
ur 19 FUR 8	0	5	6	7	0
ur 19 FUR 28	0	20	6	5	0
ur 7 FUR 28	0	12	13	13	0
ur 13.22 FUR 10	0	13	16	15	0
ur 4.6 FUR 0,r 17	0	2	3	4	16

TABLEAU 29bis-Diamètre en mm des thalles âgés de 5 jours de souches ur⁻ FUR cultivées sur différentes pyrimidine

(----) signifie thalle grêle

(====) signifie thalle très grêle

Pour les thalles grêles la mesure du diamètre conduit à surestimer la croissance.

L'incorporation des pyrimdines est très ralentie chez les mutants FUR 0, particulièrement pour l'uracile. Une perméabilité ou une transformation anormalement basse pour l'uracile exogène peuvent être en cause. Il peut paraître logique de retenir la première éventualité si le niveau de l'UMPPase est normal chez la souche FUR 0. Notons que cette manière d'interpréter les faits sous-entend que l'UMPPase est le seul enzyme catalysant la transformation de l'uracile exogène en UMP; en l'absence chez le Coprin de mutants dépourvus d'activité UMPPase il est difficile de s'en assurer. Chez la Levure, une souche mutée au locus FUR 1-5(contrôlant l'activité UMPPase) incorpore moins d'uracile que la souche sauvage et possède in vitro une activité spécifique équivalente.

Un choix entre les deux interprétations formulées ci-dessus, fondé sur le critère d'activité de l'UMPPase in vitro, est donc hasardeux. Il serait intéressant d'analyser le métabolisme de l'uracile exogène chez les souches FUR 0 afin de savoir si ce métabolite est transformé en UMP de manière normale.

Il est prévisible que la présence d'une mutation au locus FUR 0 chez une souche ur^- soit défavorable à la croissance de cette souche en raison de l'incorporation réduite de pyrimidines liée à cette mutation. Les souches recombinées FUR 0, ur^- issues des croisements entre la souche FUR 0.1 et les souches ur 1.5, ur 19 , ur 4.20, ur 7.40, ur 13.22 sont létales. L'analyse des tétrades permet de détecter les spores ur^-, FUR 0: leur capacité de germination est intacte mais leur croissance s'arrête après la formation de quelques hyphes. L'addition d'uracile, d'uridine, de cytidine ou des trois à la fois à des concentrations élevées (10^{-3}M) dans le milieu de germination n'a pas permis de lever la létalité des ur^- FUR 0. Il a été possible de faire survivre de telles souches en introduisant dans leur génome la mutation r 17 qui permet l'utilisation de l'acide orotique par les ur^-. La croissance des souches ur 4, r 17, FUR 0 est

normale en présence d'acide orotique mais elle est très lente en présence d'uracile, d'uridine ou de cytidine (tableau 29 bis). L'utilisation de l'acide orotique a donc certainement lieu par d'autres voies que celles des trois autres pyrimidines. Cette vue est confirmée par l'étude des diverses souches ur⁻, r 17: le fait que l'acide orotique ne soit pas utilisé par les souches ur 13, r 17 bloquées après cet intermédiaire dans la voie de biosynthèse prouve que l'acide orotique exogène après avoir pénétré dans la cellule est transformé en UMP par les étapes normales de la voie de biosynthèse: acide orotique $\xrightarrow[\text{OMPPase}]{}$ OMP $\xrightarrow[\text{OMPDCase}]{}$ UMP. Il est intéressant de noter que les thalles ur 4, r 17, FUR 0 sont incapables de se développer à partir de spores sur le milieu de germination qui permet pourtant la croissance de tous les auxotrophes obtenus jusqu'à présent alors que ces thalles peuvent croître, lentement il est vrai, en présence d'uridine ou de cytidine. Il est possible que la capacité d'absorber les nucléotides varie beaucoup au cours de la germination comme l'ont observé SCHILTZ et TERRY (1970) pour les conidies de Neurospora crassa. Le traitement auquel ont été soumises les spores ur 4, r 17, FUR 0 sur

Tableau 30

		+ iso 10 (1)	FUR 0.1 (1)
Incorporation d'uridine		100*	20
TCA	Rapport $\frac{\text{soluble}}{\text{insoluble}}$	1,48	0,94
répartition dans la fraction TCA soluble	uracile	17	47
	uridine	37	45
	nucléotides	46	8

Incorporation d'uridine ^{14}C dans la souche sauvage + iso 10 (1) et dans la souche mutée FUR 0.1 (1).

* La valeur indiquée pour + iso 10 est arbitraire ; l'incorporation d'uridine 14C par FUR 0.1 est figurée en pourcentage de l'incorporation par + iso 10.
Conditions de culture : standard. l'uridine marquée est fournie 4 h avant la récolte du mycélium.

Tableau 31

Dicaryotes	Uracile incorporé
(FUR 0) x (FUR 0)	9
(FUR 8) x (FUR 8)	52
(FUR 28) x (FUR 28)	110
(+ +) x (+ +)	100*
(FUR 0 +) x (+ FUR 8)	65 (31)
(FUR 0 +) x (+ FUR 28)	55 (60)
(FUR 8 +) x (+ FUR 28)	82 (81)

Incorporation d'uracile ^{14}C par des dicaryotes formés entre différentes souches FUR

Les dicaryotes ont été ensemencées sur le milieu radioactif (uracile 2.10^{-4}M) et récoltés au bout de 96 h. le nombre entre parenthèses correspond à la moyenne arithmétique des incorporations de chacune des souches homodicaryotiques.

*Unités arbitraires. Les quantités d'uracile incorporées par les autres souches sont exprimées en % de l'uracile incorporé par le dicaryote (+ +) x (+ +).

milieu de germination (présence d'acide orotique, d'uridine et de cytidine 10^{-3}M, apport d'extrait de crottin liquide, incubation 2 heures à 37°C) a permis de franchir la période critique que constitue la germination.

Nous avons cherché à mettre en évidence in vivo les conséquences physiologiques de la diminution du niveau de l'uridine kinase chez la souche FUR 0.1.

Les conséquences attendues d'une déficience partielle de l'uridine kinase sont: l'accumulation d'uracile et d'uridine, la formation d'UMP en faible quantité à partir d'uridine exogène. L'incorporation d'uridine ^{14}C par FUR 0.1 et + iso 10 (1) fait apparaître des différences en ce qui concerne le devenir de l'uridine exogène chez ces deux souches (tableau 30).

L'incorporation d'uridine ^{14}C est beaucoup plus lente chez FUR 0.1 que chez + iso 10. La radioactivité incorporée dans les macromolécules (fraction TCA insoluble) est relativement plus élevée chez FUR 0 que chez + iso 10 par rapport à celle de la fraction de TCA soluble. Dans la fraction TCA soluble la proportion d'uracile et d'uridine est élevée, celle de nucléotides est faible chez FUR 0 par rapport aux proportions observées chez + iso 10. Les résultats obtenus concordent avec les prévisions: ils constituent un argument en faveur du rôle de l'uridine kinase in vivo dans la transformation de l'uridine exogène en nucléotide. On peut concevoir que chez la souche sauvage, en l'absence de pyrimidines dans le milieu de culture, l'uridine kinase permet le recyclage de l'uridine endogène. L'excrétion d'uracile ou d'uridine par les souches dont l'activité uridine kinase est faible serait due au ralentissement de ce recyclage.

Nous avons étudié les relations physiologiques entre les diverses souches FUR au moyen de dicaryotes (FUR x +) x (+ FUR y) et de doubles mutants FUR x FUR y issus de la fructification de ces dicaryotes (tableaux 31 et 32).

Entre des souches FUR 0 et FUR 8 il existe une interaction qui laisse supposer que les deux loci contrôlent des fonctions physiologiques jouant des rôles analogues.

Tableau 32

Incorporation d'uracile ^{14}C par des souches comportant 2 mutations de résistance aux 5-fluoropyrimidines

souche	% incorporation d'uracile
+ iso 10	100
FUR 0.1	10
FUR 8	52
FUR 28	118
FUR 0.1 FUR 8	6 (31)
FUR 0.1 FUR 28	10 (64)
FUR 8 FUR 28	76 (86)

Les conditions d'expériences sont les mêmes que pour le tableau 31, le nombre entre parenthèses est la moyenne arithmétique du pourcentage d'uracile incorporé par rapport à la souche sauvage pour les deux souches dont le croisement a donné naissance au double mutant.

Cette interaction se manifeste chez les doubles mutants FUR 0.1, FUR 8 (tableau 32). La résistance d'un double mutant aux 5-fluoropyrimidines est plus élevée que celle des mutants simples. Les niveaux enzymatiques d'une souche FUR 0.1, FUR 8 ont été déterminés: l'UMPPase et l'uridine ribohydrolase ont des activités spécifiques identiques à celles de la souche sauvage, le niveau de l'uridine kinase est peu élevé, 0/7ème de celui de la souche sauvage), inférieur à celui de chacun des mutants simples FUR 0.1 et FUR 8 (tableau 28). L'interaction entre les mutations aux loci FUR 0 et FUR 8 se manifeste essentiellement au niveau de l'activité uridine kinase.

La résistance élevée des mutants FUR 0.1, FUR 8.4 à la 5-fluorouridine et à la 5-fluorocytidine pourrait être due au niveau peu élevé de l'uridine kinase chez cette souche.

Locus FUR 8.

Le locus FUR 8 est très proche du centromère du chromosome II. Il est indépendant des autres gènes de résistance.

La résistance des mutants FUR 8 aux 5-fluoropyrimidines est élevée: inférieure à celle des mutants FUR 0 au 5-fluorouracile, légèrement supérieure à celle des mutants FUR 0 à la 5-fluorouridine et à la 5-fluorocytidine.

L'incorporation de pyrimidines est inférieure à celle de la souche sauvage (tableau 27). La croissance des doubles mutants ur⁻ FUR 8 est très lente comparée à celle des mutants ur⁻ quelle que soit la nature de la pyrimidine présente dans le milieu (tableau 29bis). Il est raisonnable de penser qu'il s'agit d'une conséquence de la mauvaise incorporation des pyrimidines liée à la mutation FUR 8. L'excrétion des pyrimidines par les mutants FUR 8 (mise en évidence par la croissance de souches ur⁻ sur le "milieu d'excrétion" où a séjourné 40 heures un mutant FUR 8) est moins abondante que celle des mutants FUR 0. Les propriétés chromatographiques et spectrophotométriques du produit excrété sont analogues à celles de l'uridine. La quantité d'uridine excrétée en 40 heures est 50 nanomoles par mg de protéines.

L'étude enzymologique du mutant FUR 8.4 permet de mettre en évidence des niveaux des enzymes de la biosynthèse de l'UMP voisins de la souche sauvage: 75% de l'activité ATCase de la souche sauvage, une activité DHOase analogue à celle de la souche sauvage. L'UMPPase et l'uridine ribohydrolase sont un peu plus actives que celles de la souche sauvage, l'activité de l'uridine kinase atteint 2/3 de celle de + iso 10 (1).

La résistance élevée à la 5-fluorouridine et à la 5-fluorocytidine peut être mise en relation avec l'excrétion d'uridine et l'activité peu élevée de l'uridine kinase.

Locus FUR 10

Ce locus est situé sur le chromosome VIII à 10 unités de crossing-over du locus FUR 0. Le mutant FUR 10 dont nous disposons est très résistant aux 5-fluoropyrimidines: sa résistance est un peu inférieure à celle des mutants FUR 8. Le taux de pyrimidines incorporées par la souche FUR 10 est supérieur à celui des mutants FUR 8 et inférieur à celui des mutants FUR 0. Ses propriétés permettent de classer la souche FUR 10 dans le groupe des mutants très résistants au 5-fluoro-uracile, à la 5-fluorouridine, à la 5-fluorocytidine et incorporant moins d'uracile d'uridine et de cytidine que la souche sauvage. Ce groupe comprend les mutants FUR 0, FUR 8 et FUR 10.

La souche FUR 10 n'excrète aucune pyrimidine décelable par dosage biologique contrairement aux mutants FUR 0 et FUR 8.

La présence de la mutation FUR 10 chez une souche ur^- ralentit sensiblement sa croissance mais moins que le faible taux d'incorporation de pyrimidines par le mutant FUR 10 ne le laissait prévoir (tableau 29bis).

Les enzymes ATCase, DHOase et OTCase de la souche FUR 10 ont les mêmes activités spécifiques que celles de la souche + iso 10. Les activités spécifiques de l'UMPPase, de l'uridine kinase et de l'uridine ribohydrolase sont un peu inférieures à celles de la souche sauvage. La cause primaire de ces modifications n'est pas élucidée.

Locus FUR 11

Ce locus est situé très près du centromère sur le chromosome I. La souche FUR 11.2 (1) a été plus particulièrement étudiée. Les mutants FUR 11 ont une résistance peu élevée aux 5-fluoropyrimidines. Toutefois en présence de 5-fluorouracile à la concentration $4.10^{-7}M$ dans le milieu de culture, leur croissance résiduelle permet de reconnaître aisément les thalles FUR 11 des thalles sauvages totalement inhibés.

L'incorporation d'uracile ^{14}C est ralentie chez la souche FUR 11.2 (1): 66% de l'incorporation de la souche sauvage cultivée sur milieu minimum solide.

TABLEAU 33

"Incorporation" dans les fractions TCA soluble et insoluble

Pyrimidine exogène ^{14}C	+ iso 10 (1)			FUR 11 2 (1)			% de l'"incorporation" de + iso.
	TCA soluble	TCA insoluble	Rapport TCA sol. / TCA insol	TCA soluble	TCA insoluble	Rapport TCA sol. / TCA insol	
Uracile	33	30	1,1	15	18	0,83	52
Uridine	110	54	2	111	66	17	108

Composition de la fraction TCA soluble en %

Uracile exogène	+ iso 10 (1)	FUR 11 2 (1)
uracile	37	30
uridine	26	27
nucléotides	37	43
Uridine exogène		
uracile	32	27
uridine	28	31
nucléotides	40	36

"Incorporation" d'uracile ^{14}C et d'uridine ^{14}C par + iso 10 (1) et FUR 11 2 (1)

Les souches ont été cultivées 43 h. en milieu minimum liquide (conditions standard) les pyrimidines radioactives ont été ajoutées 4 h. avant la récolte à la concentration 2.10^{-4} M.D ans les fractions TCA soluble et TCA insoluble l'"incorporation" est exprimée en nanomoles de pyrimidine ^{14}C par mg de protéines.

Afin de mettre en évidence in vivo les conséquences de l'incorporation anormale d'uracile liée aux mutations FUR 11, la souche FUR 11.2 (1) a été croisée par les souches ur 1a.16, ur 1b.33, ur 19, ur 4.6 de signe (4). Les doubles mutants ur⁻ FUR 11 ont une croissance normale en présence d'uridine et de cytidine mais en présence d'uracile leur croissance est plus lente que celle des souches ur⁻ correspondantes. Le manque d'efficacité de l'uracile pour supplémenter les souches ur⁻, FUR 11 peut provenir, soit d'une perméation modifiée, soit d'une utilisation ralentie exogène, due à la mutation FUR 11.

L'étude des fractions TCA soluble et insoluble d'une souche FUR 11.2 (1) maintenue 4 heures en présence d'uracile ^{14}C 2 ou d'uridine ^{14}C 2 a permis de comparer le métabolisme des pyrimidines exogènes chez ce mutant à celui de la souche sauvage (tableau 33): la quantité d'uracile incorporé est modifiée globalement chez FUR 11.2 (1) (52% de l'incorporation du sauvage) mais les rapports de radioactivité TCA soluble/TCA insoluble et la composition de la fraction TCA soluble ne sont pas significativement différents de ceux de la souche sauvage. Il est donc probable que le taux de pénétration peu élevé de l'uracile chez FUR 11.2 n'est pas la conséquence de la perturbation du métabolisme de l'uracile exogène mais plutôt de la faible activité d'une "perméase-uracile".

Le fait que les souches ur⁻, FUR 11 aient une croissance normale à la concentration d'uracile élevée (10^{-3}M) n'est pas contradictoire avec cette hypothèse (affinité diminuée de la perméase pour son substrat, l'uracile, ou perméabilité passive (Tableau 29bis).

L'uridine est incorporée de manière analogue chez + iso (1) et chez FUR 11.2.

Ayant observé que chez certains mutants FUR 11 l'arginine diminue la résistance au 5-fluorouracile, nous avons cherché si cette analogie avec l'effet de l'arginine sur la résistance de la souche arg 6. su 16 au 5-fluorouracile correspondait à des mécanismes physiologiques semblables chez ces souches.

L'étude des souches issues du croisement FUR 11.2 (1) x ur 1a.16 (4) montre que la mutation FUR 11 ne supprime pas le besoin en pyrimidine chez les doubles mutants ur⁻ 1a.16, FUR 11.2.

Les activités enzymatiques de la souche FUR 11.2 concernant la biosynthèse de l'UMP et les interconversions entre uracile, uridine et UMP ont été mesurées. Les activités spécifiques de l'OTCase, de la DHOase et de l'OMPPase sont identiques à celles de la souche sauvage. L'ATCase de la souche FUR 11 cultivée sur milieu minimum a une activité spécifique plus faible que celle de + iso 10 (1) et en présence de fortes concentrations de pyrimidines (tableau 35) son activité spécifique est 4 fois plus faible que sur milieu minimum.

FUR 11	Mm	Mm + uridine 10^{-2}M et uracile 10^{-2}M
ATCase	900*	200
DHOase	4.300	4.500
OTCase	4.450	4.450

Tableau 35

Effet des pyrimidines sur l'ATCase de la souche FUR 11.2 (1).(cond.st.)

L'activité spécifique de l'UMPPase de la souche FUR 11.2 (1) cultivée sur milieu minimum est identique à celle de la souche sauvage, l'uridine ribohydrolase a une activité spécifique plus élevée, l'uridine kinase une activité spécifique sensiblement plus faible que celle de la souche sauvage. Selon les résultats de l'expérience d'incorporation d'uridine ^{14}C, ces changements de niveaux enzymatiques mesurés in vitro n'ont pas de répercussions décelables sur le métabolisme de l'uridine exogène.

* L'activité ATCase d'une souche iso 10 (1) cultivée simultanément est 2.000 nanomoles/mg protéines/heure.

Locus FUR 28

Ce locus est situé sur le chromosome III à 17 u.c.o. du locus A.

Les mutants FUR 28 ont une résistance peu élevée au 5-fluorouracile mais une résistance à la 5-fluorouridine et à la 5-fluorocytidine plus élevée que celle de la souche FUR 11. Le mutant FUR 28.2 a été plus particulièrement étudié. L'incorporation d'uracile par le mutant FUR 28.2 est toujours un peu supérieure à celle de la souche sauvage; l'incorporation d'uridine et de cytidine est inférieure à celle de la souche sauvage. Une incorporation d'uracile supérieure à celle de la souche sauvage est contradictoire avec le fait que les mutants FUR 28 peuvent croître sur des concentrations de 5-fluorouracile inhibant la souche sauvage. Nous avons pu éliminer l'hypothèse d'une discrimination par ce mutant entre l'uracile et le 5-fluorouracile:

Le rapport $\frac{\text{vitesse de pénétration du 5-fluorouracile } 10^{-6}M}{\text{vitesse de pénétration de l'uracile } 2.10^{-4}M}$

mesurée chez FUR 11.2 (1) est égal à 5; cette valeur n'est pas significativement différente de celle obtenue chez la souche sauvage.

Aucune excrétion de pyrimidines par la souche FUR 28.2 (1) n'a été décelée.

Les souches ur$^-$,FUR 28 obtenues par croisement ont une croissance peu différente de celles des souches ur$^-$ (tableau 29bis); toutefois la levée par l'uracile de l'inhibition due à la présence de 5-fluorouracile à la concentration $4.10^{-6}M$ dans le milieu de culture nécessite des concentrations d'uracile moins élevées que pour la souche ur$^-$.

L'OTCase, l'ATCase, la DHOase et l'OMPDCase ont les mêmes activités spécifiques que celles de la souche sauvage. L'activité uridine kinase est peu modifiée par rapport à celle de la souche sauvage mais les activités spécifiques de l'UMPPase et de l'uridine ribohydrolase sont sensiblement plus élevées. Le niveau élevé de l'UMPPase est compatible avec l'incorporation accrue d'uracile par les mutants FUR 28.2. On peut aussi concevoir que l'activité importante de l'uridine ribohydrolase ralentisse l'incorporation de l'uridine et de la cytidine dans cette souche.

TABLEAU 36

"Incorporation" dans les fractions TCA soluble et insoluble

Pyrimidine exogène ^{14}C	+ iso 10 (1)			FUI 4 (3)			
	TCA soluble	TCA insoluble	Rapport TCA sol. / TCA insol	TCA soluble	TCA insoluble	Rapport TCA sol. / TCA insol	% de l'"i corporati de + iso.
Uracile	35	29	1,2	14,5	7	2	33
Uridine	105	44	2,4	20	8,3	2,42	19
Cytidine	114	47	2,4	28	7	4	22

Composition de la fraction TCA soluble en %

	+ iso 10 (1)	FUI 4 (3)
Uracile exogène		
uracile	37	59
uridine	26	13
nucléotides	37	28
Uridine exogène		
uracile	35	58
uridine	27	16
nucléotides	38	26
Cytidine exogène		
uracile	43	37
uridine	22	12
cytosine	0,4	0,5
cytidine	0,6	1
nucléotides	31	45

"Incorporation" de ^{14}C uracile, uridine et cytidine par + iso.10 (1) et FUI 4 (3).

Les souches ont été cultivées 43 h. en milieu Mm liquide (conditions standard). Les pyrimidines ont été ajoutées 4 h. avant la récolte à la concentration 2.10^{-4} M. L'"incorporation" dans les fractions TCA soluble et insoluble est exprimée en nanomoles de pyrimidine ^{14}C par mg de protéines.

Locus FUI 4

La mutation FUI 4 n'a pas été localisée. Le gène FUI 4 est indépendant de FUR 10 (chromosome VIII) et d'arg 8 (chromosome IV).

La résistance de la souche FUI 4 au 5-fluorouracile est faible, la résistance à la 5-fluorouridine et à la 5-fluorocytidine est élevée par rapport à celle de la souche sauvage.

L'excrétion d'uridine par le mutant FUI 4 est abondante, supérieure à celle de la souche FUR 8.4.

Les activités spécifiques des enzymes de biosynthèse de l'UMP, ATCase, DHOase, OMPPase, ainsi que l'OTCase ne sont pas différentes de celles de la souche sauvage. Par contre l'activité spécifique de l'UMPPase est un peu plus élevée que celle de la souche sauvage, l'activité uridine kinase sensiblement plus basse et l'uridine ribohydrolase atteint un niveau 4 fois supérieur à celui d'une souche sauvage. Afin de mettre en évidence les conséquences physiologiques de ces modifications enzymatiques nous avons fourni simultanément à la souche sauvage et au mutant FUI 4, de l'uracile ^{14}C, de l'uridine ^{14}C et de la cytidine ^{14}C.

Chez FUI 4, la composition des fractions TCA soluble après incorporation d'uracile, d'uridine ou de cytidine radioactifs est caractérisée par un pourcentage d'uridine moins élevé que chez la souche sauvage (tableau 36).

L'action de l'uridine ribohydrolase peut être mise en cause car le pourcentage d'uracile est plus élevé que chez la souche sauvage (sauf quand la pyrimidine exogène est la cytidine). Le pourcentage de nucléotides dans la fraction TCA soluble est peu diminué alors que l'activité spécifique de l'uridine kinase est inférieure à celle de la souche sauvage.

Bien que la modification la plus importante observée chez la souche FUI 4 soit celle de la ribohydrolase, les informations dont nous disposons ne permettent pas de déterminer s'il s'agit de l'effet

d'une mutation dans un gène de structure ou de régulation de l'uridine ribohydrolase ou de l'effet secondaire d'une autre mutation. D'une façon générale, le caractère pléiotrope des mutations de résistance rend leur interprétation difficile.

Un schéma du devenir des pyrimidines exogènes et des interconversions susceptibles d'intervenir dans le recyclage des pyrimidines d'origine biosynthétique a été établi.

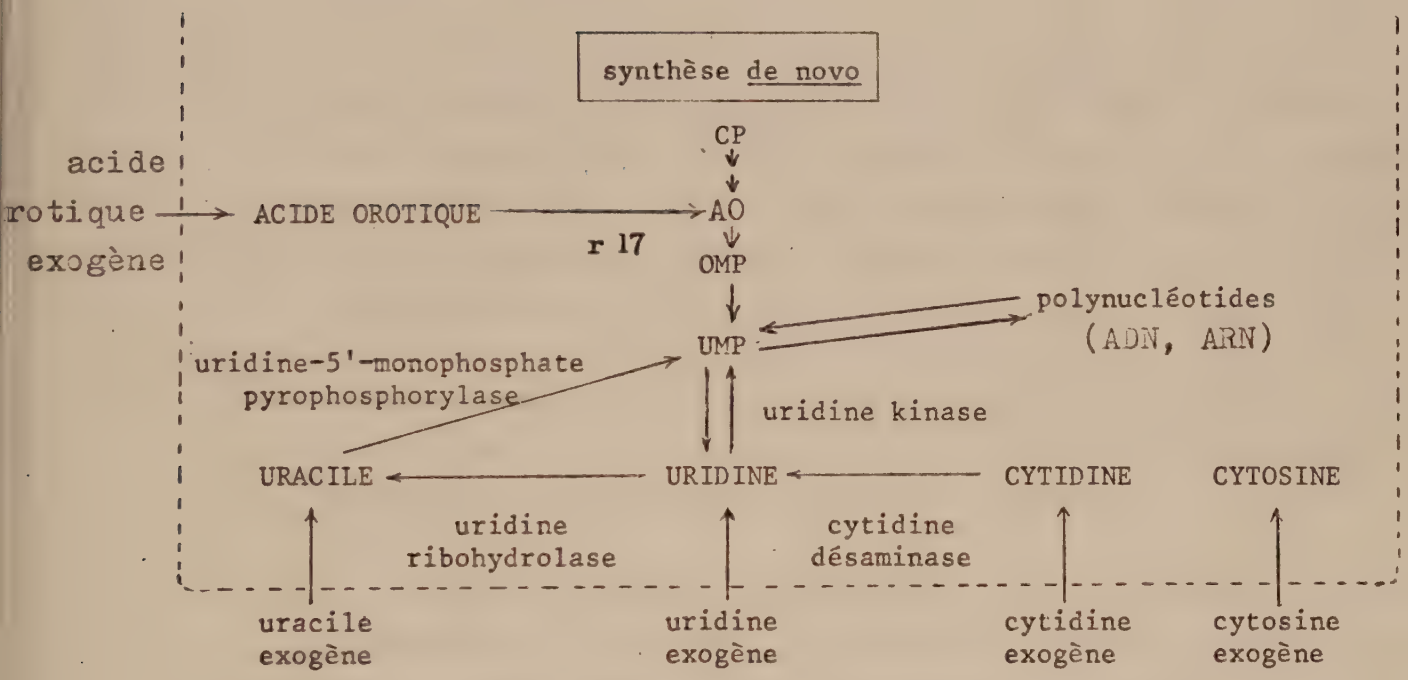


Fig. 31 - Devenir des pyrimidines exogènes et interconversion entre bases-nucléosides-nucléotides pyrimidiques chez le Coprin.

DISCUSSION

Les étapes de la biosynthèse de l'UMP par la voie de l'acide orotique mises en évidence par PREVOST (1962 et 1965) ont été confirmées au cours de ce travail. Cette chaîne métabolique a pu être complétée et les relations gène-enzyme sont donc établies pour chacune de ses 6 étapes chez Coprinus radiatus (fig. 21).

Chez d'autres organismes l'existence de déviations ayant pour point de départ un métabolite intermédiaire de cette voie est responsable de la croissance en milieu minimum des souches mutées à certains loci. C'est le cas des mutants DHOase$^-$ chez Neurospora crassa (CAROLINE, 1969),et des mutants OMPPase$^-$ chez Saccharomyces cerevisiae (JUND et LACROUTE, 1972) dont la bradytrophie a rendu l'isolement difficile. L'acide uréidosuccinique dans le premier cas, l'acide orotique dans le second, sont transformés en UMP par des enzymes ne faisant pas partie de la voie de biosynthèse de novo. Chez C. radiatus deux faits sont en faveur de l'existence d'une voie unique allant du carbamylphosphate à l'UMP avec l'acide orotique comme intermédiaire: l'isolement dans les conditions ordinaires de sélection de souches mutées à tous les loci ur$^-$ et l'auxotrophie de mutants DHOase$^-$, DHOdéhase$^-$, OMPPase$^-$ et OMP DCase$^-$.

Alors que la voie de biosynthèse de l'UMP est identique des bactéries auxmammifères, la régulation de l'activité des enzymes est très variée selon les organismes. Nous citerons quelques exemples pris chez les bactéries avant de comparer de manière détaillée le cas du Coprin à celui des deux autres champignons, Levure et Neurospora. Aucune régulation par variation du taux de synthèse des enzymes n'a été observée chez Pseudomonas aeruginosa (ISAAC et HOLLOWAY, 1968) . Chez Bacillus subtilis (BETHELL et JONES, 1969)et chez Streptococcus faecalis (PRESCOTT et JONES, 1970) aucun contrôle de l'ATCase par rétroinhibition n'a pu être mis en évidence. Chez Escherichia coli la synthèse de tous les enzymes de la voie de biosynthèse est réprimée par l'uracile. Les quatre derniers enzymes sont soumis à un contrôle coordonné par

répression et dérepression alors que le contrôle des deux autres enzymes n'est pas coordonné: l'ATCase peut être déréprimée 100 à 400 fois tandis que la DHOase et la DHOdéhase le sont 10 fois (BECWITH et coll., 1962). La CPSase est inhibée *in vitro* par l'UMP, produit final de la voie de synthèse *de novo* (PIERARD et coll., 1965). L'ATCase est rétroinhibée par les dérivés de la cytosine; le meilleur inhibiteur naturel connu est le d CTP (GERHART et PARDEE, 1962).

Il est intéressant de comparer les résultats obtenus chez *C. radiatus* concernant la régulation de la biosynthèse de l'UMP à ceux obtenus chez *S. cerevisiae* et *N. crassa*. Ces trois organismes possèdent en effet de nombreux points communs: la synthèse des deux premiers enzymes de la voie de biosynthèse de l'UMP, CPase ur et ATCase y est contrôlée par un seul locus (PREVOST, 1966; LACROUTE, 1966; DAVIS et WOODWARD, 1962) et de nombreux arguments sont en faveur de l'existence d'un complexe protéique bifonctionnel CPSase ur-ATCase (HIRSCH, 1968; JULLIEN, 1969; LUE et KAPLAN, 1970; WILLIAMS et coll. 1970). De plus l'étude de la localisation cytologique des enzymes au début de la chaîne de l'UMP et de la chaîne de l'arginine chez *C. radiatus* (CALLEN, 1973) et chez *N. crassa* (BERNHARDT et DAVIS, 1972) a fourni des résultats très semblables. Chez ces deux organismes la CPSase arg et l'OTCase ont une localisation essentiellement mitochondriale tandis que l'ATCase n'est pas mitochondriale; elle est en majeure partie nucléaire chez *N. crassa*.

Chez la Levure la CPSase ur est très sensible au contrôle par l'uracile *in vivo*: les mutants dépourvus de CPSase arg, prototrophes en milieu minimum grâce à la décompartimentation du CPur, ne peuvent pas se développer en présence d'uracile. Chez le Coprin, l'étude des mutants ur 1 b suppresseurs d'arg5 (mutants CPSase arg^-) par MASSON (1971) montre que la présence de pyrimidines dans le milieu de culture des souches arg5, ur 1 b n'entraîne pas de besoin arginine: l'effet suppresseur dû à la décompartimentation du carbamyl phosphate synthétisé par la CPSase ur (fig. 19 A ·) est insensible aux pyrimidines. D'autres mutations au locus ur 1 ont permis d'obtenir des suppresseurs d'arg5 sensibles à l'uracile. L'un d'entre eux, ur 1.67, a été particulièrement étudié; la croissance des souches arg 5.10, ur 1.67 et arg 5.11, ur 1.67 est totalement inhibée par des concentrations environ 10^{-3}M en pyrimidines. Ces variations concernant l'influence des pyrimidines sur

des mutants du groupe ur 1 suppresseurs d'arg5 sont interprétées par MASSON comme étant le résultat de modifications du complexe enzymatique CPSase ur-ATCase: chez le mutant ur 1.67 l'activité CPSase ur du complexe serait fortement inhibable par un produit terminal. On peut imaginer que le complexe enzymatique comporte une partie régulatrice modifiée chez ur 1.67. Chez N. crassa la CPSase ur du complexe est complètement inhibée in vitro par l'UTP 10^{-3}M (WILLIAMS et coll., 1970). La CPSase et l'ATCase sont codéréprimées par carence en pyrimidines (WILLIAMS et DAVIS, 1970).

Selon les résultats de ce travail la synthèse de l'ATCase de C. radiatus est contrôlée par répression et dérepression et son activité est sensible à la rétroinhibition par l'UTP, le CTP étant beaucoup moins efficace. Il est difficile de savoir le quel de ces deux processus joue le rôle physiologique le plus important. Les coefficients de répression ou de dérépression obtenus varient de 2 à 6 et l'inhibition de l'ATCase pour l'UTP atteint 40%. Le fait de n'avoir pas obtenu de mutants désinhibés pour l'ATCase parmi les résistants aux 5-fluro-pyrimidines peut constituer un argument en faveur d'un rôle peu important de la rétroinhibition.

Le fait que le niveau de l'ATCase soit plus variable que celui des autres enzymes parait avantageux pour l'organisme: lors d'une carence en pyrimidines une élévation notable de l'ATCase peut augmenter le débit de la chaîne si les autres enzymes ne sont pas saturés: le fait que le niveau des autres enzymes soit peu ou pas augmenté constitue une économie pour la cellule. Chez N. crassa le niveau de l'ATCase peut varier d'un facteur 3 à un facteur 12. La variation du niveau des enzymes suivants ne dépasse généralement pas un facteur 4 (CAROLINE et DAVIS, 1969).

On n'observe pas de répression coordonnée des quatre enzymes terminaux chez les trois organismes considérés.

Pour la DHOase du coprin nous n'avons pas observé de variations de niveau importantes: qu'il s'agisse de la souche sauvage cultivée en présence de 6 azauracile ou de mutants ur⁻ cultivés en carence pyrimidique, l'augmentation d'activité spécifique ne dépasse pas 50%

dans nos conditions d'expérience. Les mutants bloqués dans la chaîne de l'UMP après l'acide dihydroorotique ont une activité DHOase plus élevée que les mutants ur I bloqués avant (tableau 8 p.30). Cette observation constitue un argument en faveur d'une faible induction de la DHOase par un produit du début de la chaîne, AUS ou DHO; toutefois l'existence d'une différence assez minime entre les activités spécifiques de la DHOase chez une souche DHOdéhase$^-$ d'une part et une souche CPSase ur$^-$ ATCase$^-$ DHOdéhase$^-$ n'est pas très favorable à cette hypothèse (tableau 10 p. 32). La DHOase de C. radiatus paraît être soumise à une régulation peu importante dont le mécanisme n'est pas élucidé. Chez N. crassa un facteur de variation plus élevé a été observé par CAROLINE et DAVIS (1969) chez les mutants DHOdéhase$^-$ et OMPPase$^-$ cultivés en carence pyrimidique (activité spécifique DHOase x 2) mais les mutants déficients en CPSase ur ou en ATCase montrent parfois aussi une augmentation du niveau de la DHOase. Les auteurs envisagent la possibilité d'une induction de la DHOase par l'acide uréidosuccinique sans exclure que la dégradation de la DHOase au sein de la cellule puisse jouer également un rôle régulateur. La possibilité de mettre en évidence de façon claire comme LACROUTE (1966) l'a fait pour la Levure une induction directe de la DHOase par l'AUS n'existe ni chez Neurospora ni chez le Coprin où aucun mutant utilisateur d'AUS n'a pu être obtenu.

En ce qui concerne le DHOdéhase les résultats obtenus chez le Coprin sont plutôt en faveur d'une induction assez faible par un produit du début de la chaîne de biosynthèse (tableau 8 p. 30) mais il n'existe pas de preuve directe de cette induction. Il en est de même chez Neurospora où l'activité DHOdéhase est contrôlée de manière plus importante que chez le Coprin (facteur x 4,6) par une induction due à l'acide dihydroorotique et d'une manière moindre par variation du taux de synthèse ou de dégradation de l'enzyme (CAROLINE et DAVIS, 1969). LACROUTE (1966) a fait la démonstration directe de l'induction de la DHOdéhase de Levure par l'acide dihydroorotique (facteur x 14) au moyen des souches comportant la mutation or qui permet l'utilisation du DHO.

L'OMPPase du coprin est rétroinhibée in vitro par l'UTP et le CTP. Une souche OMPDCase⁻ a une activité spécifique sensiblement plus élevée que la souche sauvage et que les autres souches ur⁻ (tableau 8 p. 30). La démonstration directe d'une induction de l'OMPPase par l'acide orotique n'a pas été obtenue de façon claire. Bien que l'acide orotique pénètre rapidement dans le mycélium des souches comportant la mutation r 17 (fig. 22bis C) il aurait été préférable d'utiliser des concentrations d'acideorotique plus élevées que 3.10^{-4}M; par ailleurs, si l'induction de l'OMPPase est un processus lent, des temps de culture supérieurs à 43 heures pourraient vraisemblablement permettre d'obtenir des résultats plus nets.

L'OMPPase de Levure (JUND et LACROUTE, 1972) n'est ni inductible ni répressible dans les conditions habituelles d'expériences. Par contre l'OMP décarboxylase (LACROUTE, 1966) est inductible par un précurseur comme le sont l'OMPPase et l'OMPDCase des cellules humaines (PINSKY et KROOTH, 1967). Chez la Levure l'inducteur le plus probable est l'acide dihydroorotique.

Des informations d'ordre génétique et d'ordre physiologique ont été obtenues concernant le mode d'action de la mutation r 17. D'une part entre les sites mutés ur 7.40 et r 17 le pourcentage de recombinaison est inférieur à 1; la mutation r 17 pourrait donc affecter le gène qui contrôle la synthèse de l'OMPPase ou une région très proche de ce gène. D'autre part, la transformation de l'acide orotique exogène en UMP par les enzymes de la voie de synthèse de novo a pu être démontrée grâce à deux observations. La première est l'impossibilité pour des souches ur⁻ bloquées à une étape située après l'acide orotique d'utiliser cet intermédiaire. La seconde est la capacité des souches ur⁻,r 17,FUR O de croître en présence d'acide orotique alors que les mutations FUR O entraînent la létalité des souches ur⁻,FUR O en empêchant l'utilisation des autres pyrimidines exogènes. De plus, les constantes d'affinité de l'OMPPase, notamment vis à vis du CTP, apparaissent modifiées chez

la souche r 17: grâce à cette protéine modifiée, l'acide orotique exogène serait transformé en OMP, ultérieurement décarboxylée en UMP. On peut émettre deux types d'hypothèses sur le mode d'action de la mutation r 17. D'une part il peut s'agir d'une affinité accrue de l'OMPPase pour l'acide orotique, d'autre part il est possible que chez les mutants r 17 l'OMPPase soit plus accessible à l'acide orotique exogène que chez la souche sauvage.

Chez les trois Eucaryotes que nous avons comparés la régulation de la biosynthèse de l'UMP résulte de processus variés. Un caractère commun aux trois organismes est le rétro contrôle de l'ATCase, et de la CPSase ur dans les cas où elle a été étudiée, par l'UTP; la régulation de la synthèse de cet enzyme par répression sous l'effet de produits terminaux de la chaîne de biosynthèse a également été mise en évidence chez les trois organismes. Pour les enzymes intervenant après l'ATCase les mécanismes régulateurs sont très divers. Chez S. cerevisiae le taux de synthèse des derniers enzymes est contrôlé par induction sauf pour l'OMPPase qui échappe aussi à la répression; chez N. crassa les résultats sont moins nets: la DHOdéhase est induite par son substrat mais le mode de régulation de la DHOase n'est pas éclairci; aucune indication n'est donnée sur la régulation de l'OMPPase et de l'OMPDCase. Chez C. radiatus les niveaux des enzymes situés après l'ATCase sont moins variables que chez les deux autres organismes. Il est possible que leur régulation soit moins efficace que chez S. cerevisiae ou N.crassa mais la recherche de conditions de culture plus favorables, notamment les conditions de durée plus particulièrement pour les souches ur^-, pourraient permettre d'observer des variations plus importantes. Pour la DHOase et la DHOdéhase la possibilité d'une faible induction ne saurait être exclue; l'OMPPase semble soumise à une régulation plus efficace puisqu'elle est sensible à la rétroinhibition par l'UTP et le CTP et paraît faiblement induite par l'acide orotique.

Le rôle particulier joué par l'OMPPase dans la régulation de la biosynthèse des nucléotides chez les Mammifères a été souligné par TATIBANA et SHIGESADA (1972). Selon ces auteurs deux produits faisant partie de la voie de biosynthèse de l'UMP joueraient aussi un rôle important dans la régulation du métabolisme général des nucléotides puriques et pyrimidiques: l'aspartate, substrat utilisé dans les deux chaînes, et le 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP). L'activation de la CPSase ur de la rate de Mammifères par le PRPP a été mise en évidence par ces auteurs. Le PRPP contrôlerait donc deux étapes de la biosynthèse des nucléotides de l'uridine: la production de CP ur comme effecteur de la CPSase ur, et la conversion de l'orotate en OMP comme substrat. Cette dernière réaction couplée avec la décarboxylation de l'OMP en UMP pourrait constituer une étape limitante de la biosynthèse de l'UMP (BLAIR et POTTER, 1961; BRESNICK, 1965). Le contrôle de ces deux étapes par le niveau de PRPP permettrait d'ajuster les débits des étapes initiales et terminales de la chaîne.Par ailleurs, le PRPP contribuerait à maintenir l'équilibre entre le débit des étapes initiales de la biosynthèse des purines et des pyrimidines. La première réaction de la voie des purines, catalysée par la PRPP amidotransférase est une étape clé dans la régulation de la synthèse et peut être limitée par le PRPP (RAJALAKSHMI et HANDSCHUMACHER, 1968). Le PRPP intervient également dans la transformation des purines par les PRPP transférases de l'adénine, de l'hypoxanthine et de la guanine ainsi que dans la biosynthèse des NAD et produits apparentés.

Différentes pyrimidines exogènes permettent la survie des mutants ur^- bloqués dans la formation de novo de l'UMP; l'uracile, le dihydrouracile, l'uridine et la cytidine (PREVOST, 1962). Nous avons montré chez la souche sauvage que l'uracile, l'uridine et la cytidine sont métabolisés et incorporés dans les macromolécules; la cytosine et l'acide orotique pénètrent dans la cellule mais ne sont pas utilisés; la thymine et la thymidine sont vraisemblablement dans le même cas. On trouve des situations voisines mais non strictement identiques

chez la Levure (ROBICHON SZULMAJSTER, 1956) et chez Neurospora (MITCHELL et coll., 1948) où la thymine, la thymidine et l'acide orotique ne constituent pas des sources de pyrimidines dans les conditions habituelles. Chez le Coprin, la cytidine est utilisée de manière très efficace par les souches ur⁻ alors que chez les ura⁻ de levure elle ne permet qu'une croissance très lente. A la différence des mutants ura⁻ de levure qui se développent activement en présence de cytidine, les souches ur⁻ de coprin ne peuvent pas être supplémentées par la cytosine. L'activité cytosine désaminase fait probablement défaut chez le coprin car la cytosine, contrairement à la cytidine ne peut pas servir de source d'azote à la souche + iso 10 cultivée en l'absence de sulfate d'ammonium. Chez N. crassa les souches pyr⁻ sont généralement cultivées en présence d'uridine ou de cytidine.

Lorsque la souche sauvage + iso 10 est mise au contact de pyrimidines radioactives, la radioactivité se trouve concentrée dans le mycélium avec une vitesse différente selon la nature de la pyrimidine fournie. C'est l'acide orotique qui est fixé le plus rapidement puis par ordre de vitesse décroissante l'uridine, la cytidine, l'uracile et la cytosine. Il est intéressant de noter que pour des temps de contact relativement courts, de l'ordre d'une heure, la vitesse de fixation ne paraît avoir de rapport ni avec la structure chimique, ni avec la transformation ultérieure des pyrimidines concernées. Pour des temps de contacts plus longs la vitesse de pénétration décroît plus rapidement lorsque le métabolite fourni n'est pas anabolisé que lorsqu'il est utilisé par la cellule. Un équilibre de concentration entre le milieu et la cellule ou encore la régulation des perméases peuvent être mis en cause.

Nous avons plus particulièrement étudié la pénétration et le devenir de l'uracile, de l'uridine et de la cytidine. L'utilisation de produit radioactifs nous a permis de déterminer les étapes de leur anabolisme; l'étude de l'antagonisme de ces trois pyrimidines vis à vis de leurs analogues fluorés a permis de confirmer les étapes suivies. Plusieurs activités enzymatiques susceptibles de catalyser les réactions menant à ces étapes ont été mises en évidence; ces enzymes pourraient également permettre le "recyclage" des pyrimidines endogènes.

Nos résultats sont comparés avec ceux obtenus chez S. cerevisiae par LACROUTE (1966) JUND et LACROUTE (1970) et GRENSON (1969) et chez N. crassa par WILLIAMS et MITCHELL (1969).

La fixation de l'uracile chez le Coprin est lente par rapport à celle de l'uridine et de la cytidine et après absorption d'uracile ^{14}C l'importance du "pool"TCA soluble" d'origine exogène est relativement réduite chez la souche sauvage. La présence d'uracile d'origine biosynthétique en quantité assez importante dans le "pool TCA soluble" de la souche + iso 10 cultivée sur milieu minimum peut freiner l'entrée d'uracile exogène dans la cellule soit par action sur une perméase spécifique des pyrimidines et plus particulièrement de l'uracile, soit en agissant sur un équilibre de diffusion. GRENSON (1969) a mis en évidence l'existence d'une perméase uracile chez la levure; les mutants ura-p dépourvus de cette activité ne laissent pas pénétrer l'uracile alors que les vitesses de pénétration de la cytosine et de l'uridine ne sont pas affectées chez ces souches. LACROUTE (1966) a obtenu des mutants FUR 4 affectés pour la perméation de l'uracile, allèles des mutants ura-p de GRENSON (1969) et il a montré que le fonctionnement de la perméase de l'uracile était altéré par les mutations au locus FUR 4 (JUND et LACROUTE, 1970). Chez le Coprin les seuls mutants affectés spécifiquement pour la pénétration de l'uracile font partie du locus FUR 11.

L'analyse de la fraction TCA soluble d'une souche sauvage incubée en présence d'uracile ^{14}C pendant des temps très courts (30 secondes à 2 minutes) a permis de détecter trois sortes de produits marqués; l'uracile est largement majoritaire, la proportion d'uridine ne dépasse pas 6% et celle des nucléotides 2%. Pour un temps d'incubation de 2 minutes les radiochromatogrammes du "pool soluble" chez la souche sauvage de levure révèlent la présence de divers produits marqués mais aucune trace d'uracile ^{14}C. Comme chez la Levure, l'uracile est vraisemblablement transformé directement en UMP chez le Coprin, l'uridine ^{14}C de la fraction TCA soluble proviendrait de la dégradation de l'UMP formée. Les résultats de l'étude de l'antagonisme entre pyrimidines naturelles et 5-fluoropyrimidines fournissent des arguments en faveur d'une transformation directe de l'uracile en UMP

L'intervention de l'UMPPase dans la transformation de l'uracile exogène en UMP est vraisemblable. La sensibilité de cet enzyme à l'inhibition par l'UTP n'est pas en désaccord avec le fait qu'une souche dont le "pool" est pauvre en nucléotides pyrimidiques (souche ur⁻ cultivée en présence d'une concentration d'uracile limitant sa croissance) absorbe plus d'uracile que la souche sauvage dont le "pool" des pyrimidines est alimenté par synthèse de novo. Chez Salmonella thyphimurium, BECK et coll. (1972) ont montré qu'en présence d'uracile la croissance d'une souche pyr⁻ déficiente en activité UMPPase était égale à 25% de la croissance de la souche pyr⁻ correspondante; ils en déduisent que 75% de l'uracile est directement transformé en UMP en absence de la mutation upp (phénotype UMPPase⁻), la voie passant par l'uridine est donc secondaire.

L'uridine est beaucoup plus rapidement absorbée que l'uracile par le mycélium de souche sauvage de Coprin. Le "pool" TCA soluble" formé est 3 à 4 fois plus important qu'à partir d'uracile. Le rapport radioactivité de la fraction TCA soluble/radioactivité de la fraction TCA insoluble plus élevé que pour l'uracile pourrait signifier que l'utilisation de l'uridine exogène comparée à celle de l'uracile est un peu plus limitée par les étapes intermédiaires de son métabolisme que par sa pénétration.

Après une incubation rapide, 30 secondes à 2 minutes, en présence d'uridine ^{14}C, on trouve dans le "pool TCA soluble" une proportion d'uracile ^{14}C atteignant jusqu'à 35% de la radioactivité de ce "pool"; les nucléotides peuvent représenter jusqu'à 17% de la fraction TCA soluble. L'uridine constitue un substrat pour deux enzymes mises en évidence dans les extraits de Coprin: l'uridine ribohydrolase qui catalyse sa transformation en uracile et l'uridine kinase qui permet sa transformation en UMP. Deux voies de la transformation de l'uridine en UMP sont donc possibles; l'une directe, l'autre avec l'uracile comme intermédiaire. Il est probable que les deux voies coexistent dans la cellule (fig. 31). D'une part chez des mutants dont le niveau uridine kinase est peu élevé, FUR 11, FUI 4, la proportion de nucléotides dans la fraction TCA soluble reste importante sauf chez FUR 0.1, d'autre part la présence d'uracile dans la fraction TCA soluble après des temps d'incubation très courts en présence d'uridine sont en faveur

du fonctionnement de la voie indirecte avec l'uracile comme intermédiaire. Le fonctionnement simultané des deux voies est favorable à la formation rapide d'une proportion élevée de nucléotides ce qui est effectivement observé. Pour des temps de contact plus prolongés des cellules avec l'uridine, l'induction de l'uridine kinase intervient (tableaux 20 et 21) et permet une transformation active de l'uridine en UMP. Chez la Levure des mutants modifiés spécifiquement pour la perméation de l'uridine ont été obtenus ainsi que des mutants dépourvus d'uridine kinase; (GRENSON, 1969; JUND et LACROUTE, 1970) chez ces derniers, l'incubation en présence d'uridine ^{14}C amène la formation d'un "pool" d'uridine très élevé et une incorporation très faible dans la fraction insoluble. Aucun mutant de Coprin résistant aux 5-fluoropyrimidines ne semble faire partie de l'une de ces deux catégories quoique le niveau de l'uridine kinase soit modifié chez les mutants appartenant aux loci FUR 0, FUR 8, FUR 11, FUI 4.

La cytidine permet une croissance rapide des mutants ur⁻ de Coprin. Dès sa pénétration dans la cellule la cytidine est désaminée en uridine, (la proportion de cytidine marquée n'atteint pas 10% dans le "pool TCA soluble" d'origine endogène) sa transformation en UMP a vraisemblablement lieu ensuite par les mêmes voies que celles de l'uridine exogène. Les caractéristiques très voisines de l'uridine et de la cytidine comme antagonistes des 5-fluoropyrimidines, les niveaux de résistance analogues à la 5-fluorouridine et à la 5-fluorocytidine de la souche sauvage et des mutants résistants aux 5-fluoropyrimidines sont en faveur d'un devenir semblable pour ces deux produits. Cette situation parait très générale; on la trouve pour la cytosine* chez la Levure (GRENSON, 1969; JUND et LACROUTE, 1970) où l'existence d'une cytosine et d'une cytidine désaminase a été montrée in vitro. Chez Salmonella thyphimurium BECK et coll.(1972) ont montré que la cytosine ne peut pas être utilisée comme source de pyrimidine en l'absence de cytosine désaminase mais que la cytidine est susceptible de subir deux transformations différentes; soit la désamination en uridine, très active chez la Salmonelle, soit la phosphorylation en CMP par la cytidine kinase. Chez cet organisme les mutants dépourvus d'uridine kinase ne possèdent pas non plus d'activité cytidine kinase. Un seul

* La cytosine ne permet pas la croissance des mutants ur⁻ de Coprin.

enzyme possède vraisemblablement les deux activités uridine et cytidine kinase. La recherche de mutants de Coprin résistants à la 5-fluroro-cytidine pourrait conduire à l'obtention d'au moins trois classes de mutants: des mutants "de perméation", des mutants affectés dans l'activité cytidine désaminase et, si la situation est semblable à celle de la Salmonelle pour les kinases de l'uridine et de la cytidine, des mutants cytidine et uridine kinase$^-$.

Le schéma du métabolisme des pyrimidines exogènes (fig. 31) établi à partir de nos observations présente, sauf en ce qui concerne la cytosine de grandes ressemblances avec les schémas établis chez la Levure par GRENSON (1969) d'une part, JUND et LACROUTE (1970) d'autre part.

La recherche de souches résistantes aux 5-fluoropyrimidines avait été entreprise dans le but d'étudier la régulation de la biosynthèse de l'UMP. Cette méthode permet théoriquement de sélectionner deux types de mutants "de régulation": des mutants insensibles à la rétroinhibition et des mutants insensibles à la répression. Ces types de mutants ont été étudiés chez S. cerevisiae (LACROUTE, 1966; KAPLAN, DUPHIL et LACROUTE, 1967; JUND et LACROUTE, 1970; DUPHIL-DENIS, 1973) et chez S. thyphimurium (O'DONOVAN et GERHART, 1972). Les uns et les autres sont supposés résister à l'inhibition par les 5-fluoropyrimidines grâce à une surproduction de pyrimidines. Nous n'avons pas obtenu de tels mutants. L'obtention d'un mutant dont la CPSase ur est probablement hypersensible à la rétroinhibition par les produits terminaux permet de supposer, comme l'indique MASSON (1971) que les formes désinhibées sont difficiles à sélectionner. Selon une autre possibilité, si l'inhibition joue un rôle peu important dans la physiologie de la cellule, une souche désinhibée n'aurait pas d'avantage sélectif et ne pourrait pas être criblée par la méthode utilisée.

L'absence, parmi nos souches résistantes aux 5-fluoropyrimidines, de mutants déréprimés pour la synthèse de l'ATCase peut être due à la létalité de tels mutants où le métabolisme cellulaire serait par trop perturbé: formation en trop grande quantité d'acide uréidosuccinique très toxique chez le Coprin (MOTTA, 1967; CALLEN, 1968), manque

d'aspartate disponible pour la formation d'acides aminés (arginine entre autres), manque de PRPP dans le "pool" intracellulaire en raison du débit accru de la chaîne de l'UMP, déséquilibre entre la synthèse des pyrimidines et celle des purines.

L'utilisation d'analogues pour l'étude du métabolisme des pyrimidines repose sur le fait que ces produits pénètrent dans la cellule comme les pyrimidines et sont métabolisés de manière identique. Il est donc possible de prévoir les mécanismes de la résistance aux 5-fluoropyrimidines. Ceux-ci peuvent être très divers mais correspondent toujours soit à l'impossibilité de transformer l'analogue en nucléotide, soit à l'accumulation de pyrimidines.

Quelques hypothèse peuvent être formulées concernant les mécanismes de résistance chez certains de nos mutants. Les caractéristiques des mutants FUR 0 permettent de les comparer à des souches de S. cerevisiae chez lesquelles une mutation affectant l'uridine-5'-monophosphate pyrophosphorylase agirait également sur l'uridine kinase. La résistance des mutants FUR 8 est vraisemblablement en rapport avec une transformation ralentie de l'uridine en UMP et l'excrétion d'uridine. Les mutants FUR 11 sont affectés dans la perméation de l'uracile. La mutation FUI 4 a pour conséquence principale l'augmentation de l'activité uridine ribohydrolase et l'exerétion d'uridine. Pour tous ces mutants la multiplicité des modifications entraînées par les mutations conduisant à la résistance rend l'interprétation difficile.

La résistance de la souche arg 6. su 16 est due à un mécanisme bien déterminé: l'alimentation de la chaîne de l'UMP par un substrat, le carbamylphosphate, dévié de sa destination normale (synthèse d'arginine) entraîne une surproduction de pyrimidines. Cette résistance présente la particularité d'être supprimée par l'arginine qui diminue la synthèse de carbamylphosphate.

RESUME

L'objet de ce travail est l'étude de la synthèse de l'uridine-5'-monophosphate (UMP) par la voie de l'acide orotique (synthèse de novo), et à partir des pyrimidines exogènes chez Coprinus radiatus.

La première partie concerne la synthèse de l'uridine-5'-monophosphate par la voie de l'acide orotique. Le schéma des relations gène-enzyme a été complété grâce à l'identification du gène ur13 qui gouverne l'activité orotidine-5'- monophosphate décarboxylase. Ce gène a été localisé sur le chromosome VIII. Le dosage des activités enzymatiques et l'analyse des métabolites accumulés chez les divers mutants ur⁻ confirme les fonctions des quatre autres loci ur.

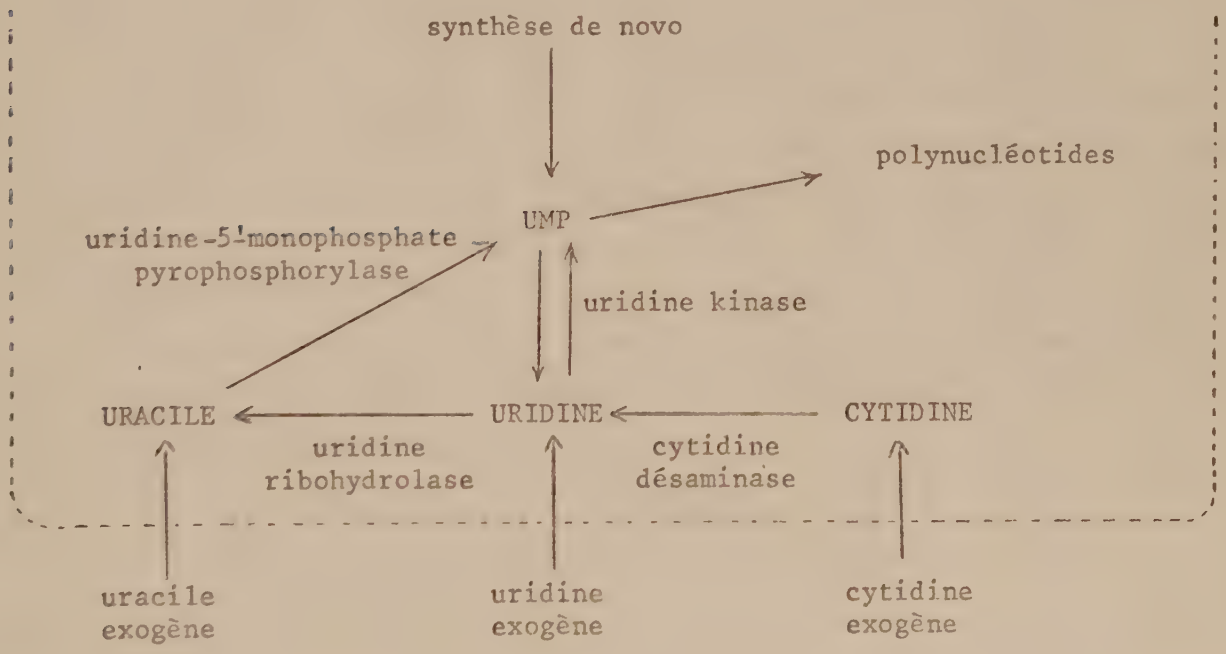
L'étude de la régulation de la synthèse de l'uridine-5'-monophosphate a apporté les renseignements suivants. La synthèse de l'aspartate transcarbamylase apparaît soumise à des mécanismes de répression par les produits terminaux. L'activité de cet enzyme est rétroinhibée par plusieurs métabolites pyrimidiques. La synthèse des autres enzymes ne paraît pas sensible à la répression, cependant l'induction de la dihydroorotate déshydrogénase et de l'orotidine-5'-monophosphate pyrophosphorylase par des précurseurs comme il a été montré chez Saccharomyces cerevisiae, ne saurait être exclue chez Coprinus radiatus. L'activité de l'orotidine-5'-monophosphate pyrophosphorylase est inhibée par l'uridine triphosphate et par la cytidine triphosphate.

L'existence de ces régulations permet de penser que l'aspartate transcarbamylase et l'orotidine-5'-monophosphate pyrophosphorylase pourraient jouer un rôle essentiel dans la régulation de la synthèse des nucléotides pyrimidiques et participer par leur niveau d'activité à l'équilibre entre la synthèse des purines et celle des pyrimidines.

Parmi les souches sélectionnées pour leur résistance à l'inhibition de croissance causée par les 5-fluoropyrimidines il n'a pas été possible d'identifier de mutants insensibles à la rétroinhibition ou à la répression. La signification de l'absence de telles souches est discutée.

Dans une deuxième partie, nous avons entrepris l'étude du devenir des pyrimidines exogènes. La radioactivité globale des thalles mis au contact de différentes pyrimidines marquées par le carbone 14 augmente de façon plus ou moins rapide selon la pyrimidine fournie. Pour des temps de contact de l'ordre d'une heure, la vitesse la plus élevée est obtenue avec l'acide orotique, ensuite viennent l'uridine, la cytidine, l'uracile et enfin la cytosine. La pénétration et la transformation en nucléotides sont deux processus distincts car ni l'acide orotique ni la cytosine ne sont utilisés comme sources de pyrimidines par les souches auxotrophes ur^-. Le fait que les souches ur^- croissent plus rapidement en présence de cytidine qu'en présence d'uracile, à concentration égale, indique que, pour l'uracile, la pénétration constitue l'étape limitante de l'utilisation.

Le schéma ci-dessous résume les interconversions entre l'uracile, l'uridine et l'UMP et les activités enzymatiques mises en évidence.



La troisième partie a été consacrée à l'étude génétique et physiologique des mutants résistants aux 5-fluoropyrimidines. On sait que ces analogues sont métabolisés par les mêmes voies que les pyrimidines; certaines des mutations obtenues pouvaient donc concerner l'une des étapes d'interconversion. Les mutants appartiennent à six loci différents dont cinq ont été localisés. Bien que le déterminisme de la résistance soit monogénique, on observe chez la plupart de ces souches la modification de plusieurs activités enzymatiques ce qui rend difficile l'explication de la résistance.

Nous possèdons des indications sur le mécanisme de résistance en jeu chez certains mutants. Les souches portant des mutations au locus fur 0 utilisent très mal l'uracile, l'uridine et la cytidine exogènes. Les caractéristiques de ces mutants permettent de les comparer à des souches de Saccharomyces cerevisiae et de Neurospora crassa chez lesquelles une mutation affectant l'uridine-5'-monophosphate pyrophosphorylase agirait également sur l'uridine kinase. Signalons par ailleurs que l'étude des souches fur 0 a permis de confirmer le devenir de l'acide orotique exogène (utilisé uniquement par les souches portant la mutation r 17): ce métabolite rejoint la voie de synthèse de novo de l'uridine-5'-monophosphate car son utilisation n'est pas affectée par les mutations au locus fur 0. Les mutations au locus fur 11 affectent l'utilisation de l'uracile d'origine externe, vraisemblablement au niveau de la pénétration. Chez la souche arg 6.su 16 la résistance est due à la surproduction de produits terminaux de la chaîne de biosynthèse de l'uridine-5'-monophosphate grâce à l'apport du carbamylphosphate de la chaîne de l'arginine.

BIBLIOGRAPHIE

1. AMES, B.N., MARTIN, R.G., GARRY, B. - (1961). The first step of histidine biosynthesis. J. Biol. Chem. 236, 2019-2026.

2. ANDERSON, E.P., et BROCKMAN, R.W. - (1964). Feedback inhibition of uridine kinase by cytidine triphosphate and uridine triphosphate. Biochim Biophys. Acta. 91, 380-386.

. ARCHIBALD, R.D. (1944). J. Biol. Chem. 156, 121. cité réf 38.

3. AXELOOS, M., et PEAUD-LENOEL, C. - (1966). Usage d'un gradient d'élution dans la chromatographie des nucléotides sur papier échangeur d'ion. 4è Symposium international sur la chromatographie, 330-338. Bruxelles, Presses académiques européennes.

4. BECK, C.F., INGRAHAM, J.L., NEUHARD, J., THOMASSEN, E. - (1972). Metabolism of pyrimidines and pyrimidine nucleosides by Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 110, 219-228.

5. BECKWITH, J.R., PARDEE, A.B., AUSTRIAN, R., et JACOB, F. - (1962) - Coordination of the synthesis of the enzymes in the pyrimidine pathway of E. coli. J. Mol. Biol. 5, 618-634.

6. BERNHARDT, S.A., et DAVIS, R.H. - (1972). Carbamoyl phosphate compartmentation in Neurospora : Histochemical localization of Aspartate and Ornithine transcarbamoylases. Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 1868-1872.

7. BETHELL, M.R., et JONES, M.E. - (1969). Molecular size and feedback regulation characteristics of bacterial Aspartate transcarbamylase. Arch .Biochem. Biophys. 134, 352-365.

8. BLAIR, D.G.R., et POTTER, V.R. - (1961). Inhibition of orotidylic acid decarboxylase by uridine 5'-phosphate. J. Biol. Chem. 236, 2503-2506.

9. BRAY, G.A. - (1960). A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in liquid scintillation counter. Analyt. Biochem. 1, 279-285.

10. BRESNICK, E. - (1965). Early changes in pyrimidine biosynthesis after partial hepatectomy. J. Biol. Chem. 240, 2550-2556.

11. CABET, D., GANS, M., HIRSCH, M.L., et PREVOST, G. - (1965). Mode d'action de deux gènes suppresseurs de l'effet des gènes ur-1a chez Coprinus radiatus. C.R. Acad. Sci. (Paris) 261, 5191-5195.

12. CABET, D. - (1966). Etude de l'action de gènes suppresseurs du besoin en uracile chez Coprinus radiatus. C.R. Soc. Biol. (Paris). 160, 919-921.

13. CABET, D., GANS, M., MOTTA, R., et PREVOST, G. - (1967). Interaction entre les chaînes de biosynthèse de l'arginine et de l'uracile et son exploitation en vue de la sélection de gènes mutés ches le Coprin. Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris). 40, 1537-1543.

14. CABET-BUSSON, D. - (1973). Etude génétique et physiologique de la biosynthèse de l'arginine chez Coprinus radiatus. Thèse d'Etat ; Université Paris VI.

15. CALLEN, J.C. - (1968). Essai concernant la mesure du débit de chaînes métaboliques chez le Coprin. DES de physiologie végétale ; Université Paris-Sud, Centre d'ORSAY.

16. CALLEN, J.C. - (1972). Sur la régulation du métabolisme de l'arginine chez Coprinus radiatus. Thèse de 3è cycle. Université Paris-Sud, Centre d'ORSAY.

17. CALLEN, J.C. - (1973). La biosynthèse de l'arginine chez Coprinus radiatus, régulation et localisation intracellulaire de quelques enzymes. Ann. Microbiol. (Institut Pasteur). 124, 345-358.

18. CAROLINE, D.F. - (1969). Pyrimidine synthesis in Neurospora crassa : gene-enzyme relationships. J. Bacteriol. 100, 1371-1377.

19. CAROLINE, D.F., et DAVIS, R.H. - (1969). Pyrimidine synthesis in Neurospora crassa : regulation of enzyme activities. J. Bacteriol. 100, 1378-1384.

20. CHATTAWAY, F.W. - (1944). Growth stimulation of Lactobacillus casei E by pyrimidines. Nature. 153, 250-251.

21. CRAWFORD, I., KORNBERG, A., et SIMMS, E.S. - (1957). Conversion of uracil and orotate to uridine 5'-phosphate by enzymes in Lactobacilli. J. Biol. Chem. 226, 1093-1101.

22. DAVIS, R.H., et WOODWARD, V.W. - (1962). The relationship between gene suppression and aspartate transcarbamylase activity in pyr-3 mutants of Neurospora. Genetics. 43, 1075-1083.

23. DENIS-DUPHIL, M. - (1973). Etude biochimique et génétique du complexe Carbamylphosphate synthétase - Aspartate transcarbamylase chez Saccharomyces cerevisiae. Thèse d'Etat. Université Paris VI.

24. EAKIN, R.T., et MITCHELL, H.K. - (1969). A mitochondrial dihydroorotate oxydase system in Neurospora crassa. Arch. Biochem. Biophys. 134, 160-171.

25. GANS, M., et MASSON, M. - (1969). Structure fine du locus ur-1 chez Coprinus radiatus. Molec. Gen. Genetics. 105, 164-181.

26. GERHART, J.C., et PARDEE, A.B. - (1962). The enzymology of control by feeback inhibition. J. Biol. Chem. 237. 891-896.

27. GRENSON, M. - (1969). The utilization of exogenous pyrimidines and the recycling of uridine 5'-phosphate derivatives in Saccharomyces cerevisiae as studied by means of mutants affected in pyrimidine uptake and metabolism. Europ. J. Biochem. 11, 249-260.

28. HANDSCHUMACHER, R.E., et PASTERNAK, C.A. - (1958). Inhibition of orotidylic decarboxylase a primary site of carcinostasis by 6-azauracil. Biochim. Biophys. Acta. 30, 451-452.

29. HEIDELBERGER, C. - (1965). Fluorinated pyrimidines. Progress in nucleic acid research and molecular biology. 4, 1-50. Academic Press.

30. HIGNETT, R.C. - (1966). Interference of 5-fluorouracil in the biosynthesis of ribosomes in Staphylococcus aureus (Strain Duncan) Biochim. Biophys. Acta. 114. 559-564.

31. HIRSCH, M.L. - (1968). Séparation des enzymes jouant un rôle dans la compartimentation entre les chaînes de biosynthèse de l'uracile et de l'arginine chez Coprinus radiatus. C.R. Acad. Sci. Paris. 267, 1473-1476.

32. JONES, M.E. - (1971). Regulation of pyrimidine and arginine biosynthesis in mammals. In advances in enzyme regulation 9, 19-49. G. WEBER ed. Pergamon Press.

33. JULLIEN, M. - (1969). Etude des mécanismes moléculaires d'une compartimentation cellulaire chez le basidiomycète Coprinus radiatus. (Fr. ex. Bolt). Thèse de 3è cycle. Université Paris VI.

34. JUND, R., et LACROUTE, F. - (1970). Genetic and physiological aspects of resistance to 5 fluoro-pyrimidines in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 102, 607 615.

35. JUND, R., et LACROUTE, F. - (1972). Regulation of orotidylic acid pyrophosphorylase in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 109, 196-202.

36. KAPLAN, J.G., DUPHIL, M., LACROUTE, F. - (1967). A study of the ATCase activity of yeast. Arch. Biochem. Biophys. 119, 541-551.

37. KAPLAN, J.G., LACROUTE, F., et MESSMER, I. - (1969). On the loss of feedback inhibition of yeast ATCase during derepression of pyrimidine biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. 129, 539-544.

38. KORITZ, S.B., COHEN, P.P. - (1954). Colorimetric determination of carbamyl aminoacids and related compounds. J. Biol. Chem. 209, 145-150.

39. ISAAC, J.H., et HOLLOWAY, B.W. - (1968). Control of pyrimidine biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 96, 1732-1741.

40. LACROUTE, F., PIERARD, A., GRENSON, M., et WIAME, J.M. - (1965). The biosynthesis of carbamoyl phosphate in S. cerevisiae. J. Gen. Microbiol. 40, 127-142.

41. LACROUTE, F. - (1966). Régulation de la chaîne de biosynthèse de l'uracile chez S. cerevisiae. Thèse d'Etat. Faculté des Sciences. Université de Paris.

42. LE HEGARAT, F., et PREVOST, G. - (1965). Etude de mutants résistants au 5-fluorouracile chez le Coprin. C.R. Acad. Sci. Paris. 260, 1236-1238.

43. LORING, H.S., et PIERCE. - (1944). Pyrimidine nucleosides and nucleotides as growth factors for mutant strains of Neurospora. J. Biol. Chem. 153, 61-69.

44. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. - (1951). Protein measurement with the folin phendo reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

45. LUE, P.F., et KAPLAN, J.G. - (1970). Metabolic compartmentation at the molecular level of a multi enzyme agregate in the pyrimidine pathway of yeast. Biochim. Biophys. Acta. 220, 365-372.

46. MASSON, M. - (1971). Etude génétique et physiologique du locus ur-1 chez Coprinus radiatus. Thèse d'Université. Université Paris VI.

47. MITCHELL, H.K., HOULAHAN, M.B., et NYC, J.F. - (1948). The accumulation of orotic acid by a pyrimidine-less mutant of Neurospora. J. Biol. Chem. 172, 525-529.

48. MOTTA, R. - (1967). Méthode de sélection de mutants uracile-exigeants au locus ur-1 chez Coprinus radiatus. C.R. Acad. Sci. Paris. 264, 654-657.

49. NEUMANN, J., et JONES, M.E. - (1964). End product inhibition of aspartate transcarbamylase in various species. Arch. Biochem. Biophys. 104, 438-447.

50. O'DONOVAN, G.A., et NEUHARD, J. - (1970). Pyrimidine metabolism in microoganisms. Bacteriol. Rev. 34, 278-343.

51. O'DONOVAN, G.A., et GERHART, J.C. - (1972). Isolation and partial characterization of regulatory mutants of the pyrimidine pathway in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 109, 1085-1096.

52. PARVIN, R., PANDE, S.V., VENKITASUBRAMANIAN, T.A. - (1965). On the colorimetric biuret method of protein determination. Analyt. Biochem. 2, 213-219.

53. PICHON, N. - (1964). Métabolisme de l'uracile chez Coprinus radiatus Fr. ex. Bolt. DES de physiologie végétale. Faculté des Sciences de Paris.

54. PIERARD, A., et WIAME, J.M. - (1964). Regulation and mutation affecting a glutamine-dependant formation of carbamyl phosphate in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 76-81.

55. PIERARD, A., GLANSDORFF, N., MERGEAY, M., et WIAME, J.M. - (1965). Control of biosynthesis of carbamyl phosphate in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 14, 23-36.

56. PINSKY, L., et KROOTH, R.S. - (1967a). Studies on the control of pyrimidine biosynthesis in human diploïd cell strains I.Effects of 6-azauridine on cellular phenotype. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57, 925-932.

57. PINSKY, L., et KROOTH, R.S. - (1967b). Studies on the control of pyrimidine biosynthesis in human diploïd cell strains II. Effects of 5-azaorotic acid, barbituric acid and pyrimidine precursors on cellular phonotype. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57, 1267-1279.

58. PRESCOTT, L.M., et JONES, M.E. - (1970). Streptococcus Faecalis Aspartate transcarbamylase. I Purification and general properties. Biochemistry. 9, 3783-3793.

59. PREVOST, G. - (1962). Etude génétique d'un Basidiomycète : Coprinus radiatus. Fr. ex Bolt. Thèse d'Etat. Faculté des Sciences de Paris. MASSON et CIE, éditeurs.

60. PREVOST, G. - (1966). Etude du métabolisme de l'uracile chez le Coprin. C.R. Soc. Biol. (Paris). 160, 915-919.

61. RAJALAKSHMI, S., et HANDSCHUMACHER, R.E. - (1968). Control of purine de novo by orotic acid in vivo and in vitro. Biochim. Biophys. Acta. 155, 317,325.

62. REICHARD, P., et SKOLD. - (1958). Enzymes of uracil metabolism in the Ehrlich ascites tumour and mammalian liver. Biochim. Biophys. Acta. 28, 376-385.

63. REISSIG, J.L. - (1960). Forward and back mutations in the pyr-3 regions of Neurospora. J. Gen. Microbiol. 30, 327-337.

64. ROBICHON-SZULMAJSTER, H.de - (1956). La méso-inositol comme facteur de croissance pour S. cerevisiae. I. Intervention et spécificité du méso-inositol dans le métabolisme des pyrimidines. Biochim. Biophys. Acta. 21, 313-320.

65. SCHILTZ, J.R., et TERRY, K. -1(1970). Nucléoside uptake during germination of Neurospora crassa conidia. Biochim. Biophys. Acta. 209, 278-288.

66. SELLS, B.H., et CRUDUP, K. - (1966). Ribosome production during recovery from puromycin treatment : influence of 5-fluorouracil. Biochim. Biophys. Acta. 123, 253-264.

67. TATIBANA, M., et SHIGESADAK. - (1972). Two carbamyl phosphate synthetases of mammals : Specific roles in control of pyrimidine and urea biosynthesis. In advances in enzyme regulation. 10, 249-271. G. WEBER, éditor. Pergamon Press.

68. TAYLOR, W.H., TAYLOR, M.L., et EAMES, D.F. - (1966). Two functionally different dihydroorotic dehydrogenase in bacteria. J. Bacteriol. 91, 2251-2256.

69. THOMSON, R.Y. - (1960). Purines, pyrimidines and their derivatives. In chromatographie and electrophoretic techniques. Ivor Smith editor. Interscience publishers.

70. WILLIAMS, L.G., et MITCHELL, H.K. - (1969). Mutants affecting thymidine metabolism in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 100, 383-389.

71. WILLIAMS, L.G., BERNHARDT, S.A. et DAVIS, R.H. - (1970). Copurification of pyrimidine carbamyl phosphate synthetase and aspartate transcarbamylase of Neurospora crassa. Biochemistry. 9, 4329-4335.

72. WILLIAMS, L.G., et DAVIS, R.H. - (1970). Pyrimidine specific carbamyl phosphate synthetase in N. crassa. J. Bacteriol. 103, 335-341.

73. WILLIAMS, L.G., BERNHARDT, S.A., et DAVIS, R.H. - (1971). Evidence for two discrete carbamyl phosphate pools in N. crassa. J. Biol. Chem. 246, 973-978.

74. WRIGHT, L.D., MILLER, C.S., SKEGGS, H.R., HUFF, J.W., WEED, L.L., et WILSON, D.W. - (1951). Biological precursors of the pyrimidines. J. Amer. Chem. Soc. 73, 1898-1899.